



UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Farmacia

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

Tesi di Laurea

**Profilo aromatico e caratterizzazione degli acidi amari di cinque cultivar
di luppolo sano ed infetto da virus e viroidi.**

Relatore:

Dott.ssa Luisa Pistelli

Correlatore:

Dottor Pier Luigi Cioni

Candidata:

Benedetta Ferri

Anno Accademico 2015-2016

Riassunto Analitico

L'oggetto della ricerca di questa tesi sperimentale è stato quello di valutare il profilo aromatico e la caratterizzazione degli acidi amari di cinque cultivar di luppolo sano ed infetto da virus e viroidi. Lo studio si è focalizzato su cinque diverse cultivar di luppolo: Sybilla, Lubelski, Pulawski, Magnat e Marynka, coltivate e raccolte nella regione Lubelskie in Polonia nel 2015-2016. Dato che ciascuna di tali cultivar può subire l'attacco da parte del virus del mosaico del luppolo, del mosaico della mela e del viroide latente del luppolo, lo studio si è concentrato nella ricerca di eventuali differenze chimiche tra le cultivar di luppolo sano ed infetto. La prima parte della tesi è stata svolta in Polonia presso lo IUNG- Istituto delle Scienze del Suolo e della Coltivazione delle Piante (Istituto di ricerca statale dal 1950) sito in Pulawy (Polonia) usufruendo, per tre mesi, del progetto bilaterale "Erasmus Traineeship" durante il quale sono stati analizzati gli acidi amari, (α -acidi e β -acidi) mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) successivamente le resine totali, soft resins e hard resins nonché la conduttanza degli α -acidi applicando il metodo Wöllmer. La seconda parte della tesi è stata sviluppata presso il Dipartimento di Farmacia dell'Università di Pisa nel laboratorio di Biologia Farmaceutica dove è stata studiata la composizione degli olii essenziali, ottenuti per idrodistillazione, mediante la tecnica GC-MS (gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa); inoltre le indagini sulla frazione volatile sono state condotte utilizzando la tecnica della Head-Space Solid Phase Micro-Extraction (HS-SPME) abbinata alla GC-MS.

Dallo studio effettuato non sono state evidenziate differenze significative tra le cinque cultivar di luppolo sano ed infetto sia per quanto riguarda gli acidi amari, sia per le resine totali (soft resins e hard resins) sia nella composizione degli olii essenziali e della frazione volatile.

Pertanto la virosi sembra non interferire con la biosintesi dei metaboliti secondari del luppolo utili nel processo di birrificazione.

Indice

RIASSUNTO ANALITICO	1
INDICE.....	2
1- INTRODUZIONE	4
2- CLASSIFICAZIONE BOTANICA DI <i>HUMULUS LUPULUS</i> L.....	5
2.1- INQUADRAMENTO SISTEMATICO DELLA SPECIE	5
2.2- DESCRIZIONE DELLA FAMIGLIA DELLE CANNABACEAE	6
2.3- DESCRIZIONE BOTANICA DELLA SPECIE <i>HUMULUS LUPULUS</i> L.....	7
2.4- DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA	10
2.5- TECNICA DI COLTIVAZIONE E RACCOLTA.....	11
2.6- STORIA DEGLI USI NELLA MEDICINA TRADIZIONALE	12
2.7- COMPOSIZIONE CHIMICA DEL LUPPOLO	14
2.8- ATTIVITÀ FARMACOLOGICA	24
3- COLTIVAZIONI DI LUPPOLO IN POLONIA	31
3.1- ISTITUTO DI SCIENZE DEL SUOLO E DELLA COLTIVAZIONE DELLE PIANTE (IUNG)	31
3.2- VIRUS E VIROIDE NEL LUPPOLO	33
3.3- COME ELIMINARE VIRUS E VIROIDI DAL LUPPOLO	35
4- MATERIALI E METODI.....	40
4.1- STRUMENTAZIONE GENERALE	40
4.1.1- HPLC	40
4.1.2- Essiccatore rotante e titolatore conduttometrico automatico	43
4.1.3- GC-MS (Gas Cromatografia e Spettrometria di Massa)	45
4.1.4- Head-Space Solid Phase Micro-Extraction (HS-SPME)	47
4.2-PARTE SPERIMENTALE.....	48
4.2.1- Campioni di cultivar di luppolo analizzate.....	48
4.2.2- HPLC	51
4.2.3- Metodo Wöllmer.....	59
4.2.4- Profilo aromatico del luppolo.....	63
4.2.4.1- Idrodistillazione in corrente di vapore (Clevenger)	64
4.2.4.2- Gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS).....	65
4.2.3.2- SPME dei coni del luppolo.....	68

5-	RISULTATI E DISCUSSIONE	70
5.1	VALUTAZIONE DEGLI ALFA-ACIDI E BETA-ACIDI PER HPLC	70
5.2	RISULTATI OTTENUTI CON IL METODO WÖLLMER DI CINQUE CULTIVAR DI LUPPOLO SANO ED INFETTO.....	72
5.3	COMPOSIZIONE DEGLI OLII ESSENZIALI DEI CONI DI CINQUE CULTIVAR DI LUPPOLO SANO ED INFETTO.....	73
5.4	COMPOSIZIONE DELLA FRAZIONE VOLATILE EMESSA DAI CONI DI CINQUE CULTIVAR DI LUPPOLO SANO ED INFETTO.....	91
6-	CONCLUSIONI	114
6.1	CONFRONTO TRA LA COMPOSIZIONE DEGLI OLII ESSENZIALI DEI CONI DI CINQUE CULTIVAR DI LUPPOLO SANO ED INFETTO.....	114
6.2	CONFRONTO TRA LA COMPOSIZIONE DELLA FRAZIONE VOLATILE EMESSA DAI CONI DI CINQUE CULTIVAR DI LUPPOLO SANO ED INFETTO.....	123
7-	BIBLIOGRAFIA.....	130

1- Introduzione

L'origine del luppolo (*Humulus lupulus* L.) è incerta; si ipotizza che le prime specie di luppolo siano apparse in Asia e che da lì siano diffuse in direzione nord-est America ed ovest verso l'Europa. Sin dai tempi degli antichi egizi era noto il suo uso nelle preparazioni di bevande e come erba medicinale. Con l'evoluzione tecnologica dei processi produttivi avvenuti nel medioevo, si introdusse il luppolo come elemento basilare nella composizione di una bevanda ancora oggi ben nota, la birra. Circa il 97% del raccolto totale di luppolo trova il suo impiego nel processo di birrificazione ma non solo; il luppolo possiede ulteriori vantaggi come stabilizzante della schiuma, anti-batterico e nell'avere anche effetti benefici per la salute. L'aroma della birra è il risultato di un complesso sensoriale dato da molti differenti costituenti: composti non volatili come le resine totali (alfa-acidi e beta-acidi) e prenilflavonoidi (xantoumolo, DMX), volatili come gli olii essenziali (*myrcene*, *β-caryophyllene*, *α-humulene*, *(E)-β-farnesene*). Gli alfa- e beta-acidi ricoprono una funzione molto importante conferendo amarezza e stabilità al prodotto finale, i polifenoli e prenilflavonoidi hanno attività benefiche sulla salute e gli olii essenziali incidono sul gusto e sapore. Nel corso degli anni si è sviluppata sempre più la selezione agronomica di cultivar che conferiscono nuovi aromi tenendo di conto i livelli di alfa-acidi, del coumulone e degli O.E. Il luppolo è di vitale importanza per le qualità organolettiche della birra tra gusto e sapore. Le cinque cultivar di luppolo, oggetto di questo studio, provengono dalle coltivazioni della regione Lubelskie in Polonia (2015-2016): Sybilla, Lubelski, Pulawski, Magnat, Marynka. Lo scopo di questa tesi è stato quello di verificare le differenze chimiche nella sintesi dei metaboliti secondari tra le cultivar di luppolo sano ed infetto, andando a caratterizzare sia le resine totali ed acidi amari mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e metodo Wöllmer sia a livello del profilo aromatico mediante la tecnica della HS-SPME (Head-Space Solid Phase Micro-Extraction) abbinata alla GC-MS (gas-cromatografia e spettrometria di massa).

2- Classificazione Botanica di *Humulus lupulus* L.

2.1- Inquadramento sistematico della specie

Regno : Plantae

Sottoregno : Tracheofita

Superdivisione : Spermatofita

Divisione : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sottoclasse : Hamamelididae

Ordine : Urticales

Famiglia : Cannabaceae

Genere : *Humulus*

Specie : *Humulus lupulus* L.

Humulus japonicus Siebol & Zucc.

2.2- Descrizione della famiglia delle Cannabaceae

Alla Famiglia delle Cannabaceae appartengono due generi: *Humulus lupulus* L. e *Cannabis sativa* L. (Evans, 1989). Le Cannabaceae sono piante dioiche, erbe erette annuali (*Cannabis*), erbacee perenni rampicanti (*Humulus*). Sono provviste di foglie alterne od opposte, intere o palmato-lobate con stipole libere. La pianta non è laticifera. I fiori sono unisessuali, ascellari. I fiori maschili hanno una forma a pannocchia con calice pentapartito e 5 stami; mentre i fiori femminili sono provvisti di ampie brattee con calice che circonda quasi completamente l'ovario. L'ovario è uniloculare, portante un solo ovulo e termina all'apice con uno stilo bifido. L'impollinazione è anemogama. Le Cannabaceae si distinguono soprattutto per il tipo di frutto che è un achenio ricoperto dal perianzio. Il luppolo comune è una specie largamente diffusa nelle regioni temperate. La canapa è stata largamente diffusa fin dai tempi antichi in tutte le regioni calde-temperate. Alcune specie coltivate della *Cannabis sativa* L. sono utilizzate per la produzione di fibre, olii e medicinali per la terapia del dolore severo. *Humulus lupulus* L. è utilizzato principalmente come aromatizzante per la birra e come alimento. (Chadwick et Al., 1006). *Humulus lupulus japonicus*, invece, è pianta che nasce nella Manciuria, nel Giappone e forse nella Cina ed è usata esclusivamente nel giardinaggio come pianta ornamentale.

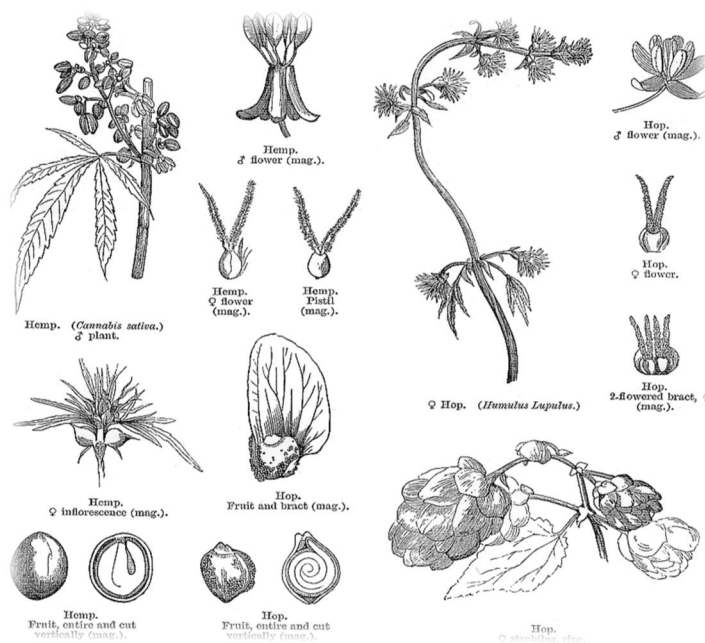


Figura 1-2 Famiglia delle Cannabinaceae.

2.3- Descrizione botanica della specie *Humulus lupulus* L.



Figura2-1 Raffigurazione botanica di *Humulus lupulus* L.

L'etimologia: *Humulus lupulus*, Linnaeus (Luppolo). L'etimologia del nome deriva dal latino *Humus* (terra) in riferimento al comportamento del fusto prostrato simil strisciante in mancanza di sostegno e *Lupus* (lupo) si presuppone per il portamento della pianta selvatica che tende a soffocare gli arboscelli su cui si arrampica alludendo alla tenacia con la quale il lupo soffoca la pecora. Plinio il Vecchio (23-79 d.C) scrittore romano, definì *Humulus lupulus* “il lupo dei salici” con allusione, probabilmente, alla tenacia con la quale i fusti del luppolo si attaccano al salice stringendosi come il lupo fa con la pecora. (Giovanni Appendino. Luppolo e Birra. Piante Medicinali. S.I.FIT. 2011). (Francesco Capasso, Raffaele Capasso. Piante medicinali. L'Erborista. 22, 2009).

Il luppolo appartiene alla famiglia delle Cannabacee (stessa famiglia della *Cannabis*), pianta erbacea perenne con vita massima di 50 anni. (Evans, 1989). La sua altezza può arrivare fino a 7-8 metri. La parte sotterranea del luppolo è organizzata in due organi sotterranei, distinti sia per la loro morfologia che per le funzioni principali. Il fusto sotterraneo e l'apparato radicale; il rizoma ha una crescita orizzontale e molto ramificata dal quale si estendono fusti legnosi, esili e volubili. Gli steli costituiscono la base del sistema fuori dalla terra. Il suo portamento è lianoso, rampicante e tortuoso. Le foglie sono palmato-lobate (3-5 lobi) con apice acuto e margine dentato, opposte, picciolate con stipole ovali. La superficie della parte abassiale (superiore) è ruvida al tatto data la presenza di numerosi peli, quella adassiale (inferiore) è resinosa. Il luppolo presenta sia infiorescenze femminili che maschili essendo una pianta dioica. (S.I.FIT. Piante Medicinali. Scienza nella tradizione. 56,2011). I fiori stamiferi (infiorescenze maschili) sono verdastri riuniti in pannocchie riccamente ramificate all'ascella delle foglie. Raggiungono un diametro di 5-6 mm. Essi hanno 5 tepali fusi alla base e 5 stami. I petali sono provvisti di ghiandole di luppolina ma il loro numero è ridotto rispetto alle infiorescenze femminili. I fiori pistilliferi (infiorescenze femminili) consistono da 20 a 60 fiori raggruppati intorno ad un asse, formate da numerose brattee fogliacee che danno origine a infiorescenze a strobilo, a forma di coni penduli; esse raggiungono una lunghezza di circa 2-4 cm e presentano un colore giallo-verdastro. (Francesco Capasso, Raffaele Capasso. Piante medicinali. L'Erborista. 22, 2009). I fiori femminili possiedono un cono membranoso che circonda un ovario uniloculare bicarpellare composto da due stimmi lunghi e pelosi senza stilo. La parte essenziale del cono è costituita da bratteole e brattee. Il frutto è un achenio color grigiastro. La riproduzione avviene per via anemofila. Gli strobili sono ricchi di ghiandole resinose che a maturità secernono una sostanza giallastra dal sapore amaro chiamata luppolina. Una sostanza polverosa ovvero un'oleoresina che vira dal colore giallo-arancio a giallo-verdognolo e dal sapore amaro).

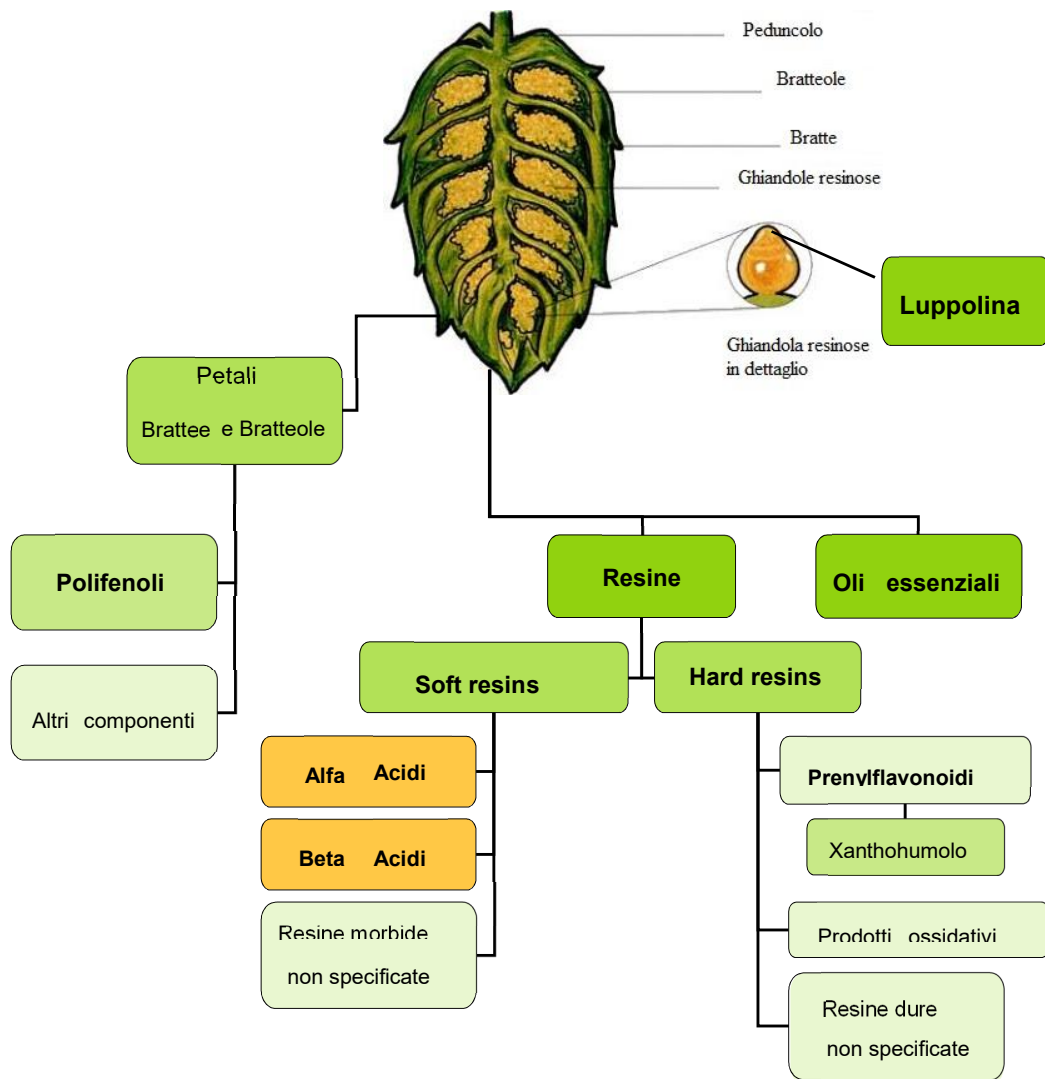


Figura 3-1 Sezione del cono di *Humulus lupulus* L. e classi dei principali composti.

2.4- Distribuzione Geografica

Humulus lupulus L. è la specie più diffusa in Europa Occidentale ed in regioni temperate dell’Australia, Sud Africa e Sud America. *H. japonicus* è endemico nell’est dell’Asia. Il luppolo selvatico europeo è considerevolmente esteso in questa area. In Europa la coltivazione è tipica in Germania, Gran Bretagna, Polonia e Repubblica Ceca. In Asia la pinata è coltivata in Cina e Giappone, Nuova Zelanda e sud dell’Australia. (Engles et Al., 2006).

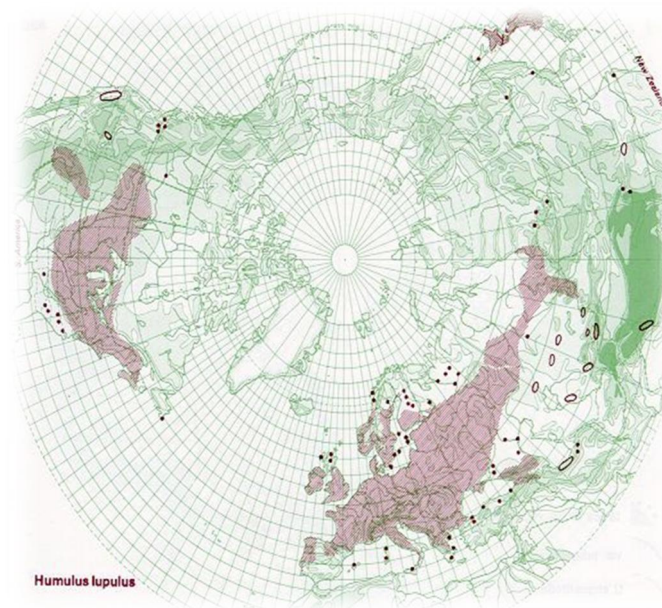


Figura 4-1 Aree crescita spontanea di *Humulus lupulus* L.

Produzione Mondiale di luppolo

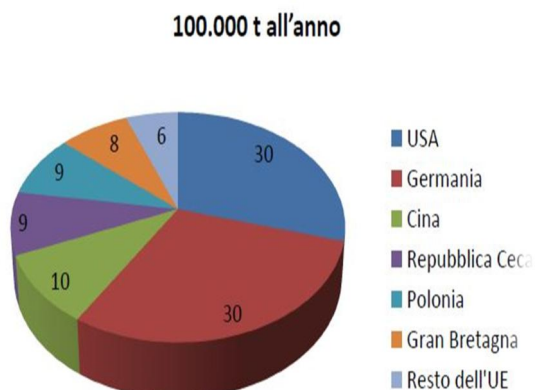


Figura 5-1 Il grafico a torta riporta il quantitativo di produzione annuale di *Humulus lupulus* L. nel

2.5- Tecnica di coltivazione e raccolta



Figura 6-1 Parte sotterranea di *Humulus lupulus* L.

Il luppolo è una pianta selvatica, spontanea; predilige ambienti freschi, luoghi incolti come le rive dei fiumi e margini di boschi fino ad un'altitudine di 1.200 metri. Essendo una pianta molto resistente, cresce anche in terreni poveri di sostanze nutritive (in riferimento anche all'origine del nome *Lupus* = lupo). Il clima deve essere poco umido, poco ventoso ed esposto al sole per 6-8 ore il giorno. La coltivazione è effettuata a partire da talee o rizoma di piante già esistenti, nei mesi di marzo ed aprile (varia a seconda dell'aria geografica in cui si trova). Come è stato già precedentemente detto, il luppolo è una pianta rampicante perciò ha bisogno di una struttura in legno (tralci o tralicci) su cui espandersi. Ogni pianta può raggiungere 2-3 metri di altezza ed arrivare a pesare 10 kg. La fioritura avviene tra fine aprile fino all'inizio di luglio, mentre il periodo di raccolta dei coni si ha da fine agosto a fine settembre. È importante capire bene quand'è il periodo balsamico per la raccolta; ovvero quando le ghiandole resinose assumono un colore dorato scuro ben visibile ed i coni al tatto sembrano esser cartacei e la loro resina rimanere attaccata alla mano. Un'eventuale attesa può comportare un cambiamento, non solo visivo del colore dei coni che iniziano ad ingiallirsi ma anche nella concentrazione dei componenti. Una volta effettuata la raccolta, le radici e rizoma rimarranno nel terreno per la nuova crescita nell'anno successivo. La pianta dovrà essere essiccata in forno fino ad ottenere un peso finale del 18-20% rispetto al peso del luppolo fresco. Il luppolo essiccato può resistere per più di un anno se conservata a riparo da fonti di luce, in ambiente fresco e ventilato (circa 5°). Dobbiamo prestare attenzione al processo di stoccaggio in quanto tutte le sostanze amare sono costituite da composti piuttosto labili che trasformano le loro resine da soft ad hard (processo di ossidazione). La conservazione avviene in un luogo buio, fresco (circa 5°C) e secco. (Prof. Ing. Václav Rybáček, Ph. D. Hop production. Developments in crop science; 16. 1991).

2.6- Storia degli usi nella medicina tradizionale

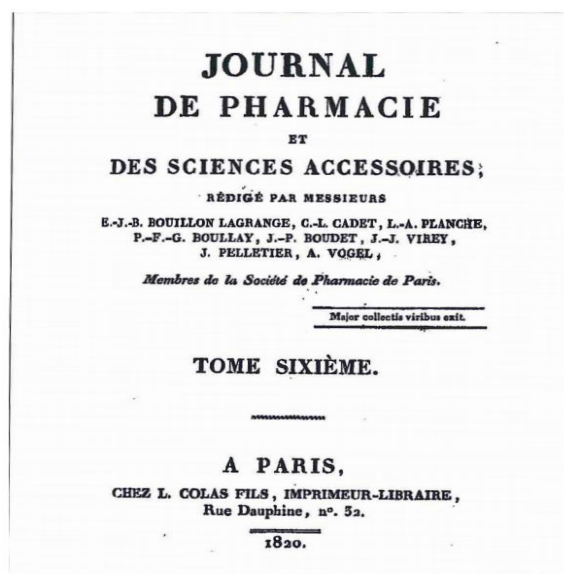


Figura 7-1 1820-Parigi. Pubblicazione del giornale “De Pharmacie”.

Già dal tempo dell’antico Egitto e dei Babilonesi erano note le attività del luppolo che veniva utilizzato nella preparazione della birra ed in altre simili bevande. Era conosciuto anche in varie tribù indigene indiane. È impossibile però risalire alla data precisa della prima preparazione. Il documento più antico di letteratura medica risale alla cultura araba. Anche al tempo dei Romani e Greci si faceva uso di luppolo nella preparazione della birra. Nel nono secolo fu scoperto il primo documento che testimoniava la crescita spontanea lungo le rive del fiume, ai bordi di foreste ed il suo portamento tortuoso sugli alberi. Nel decimo secolo, il medico Mesuë il Giovane descriveva i suoi effetti purificativi sul sangue per l’azione anti-infiammatoria contro la febbre. Nel 1160 la suora tedesca Hildegard nel trattato “Physica” di Bingen riportò le proprietà di conservazione nelle bevande e l’attività antibiotica ed antisettica. Nel 1260 “De Vegetabilibus” di Albert il Grande conosciuto come Albertus Magnus (rappresentante della dottrina monacale) portò avanti il pensiero di Hildegard; entrambi simboleggiarono lo sviluppo delle conoscenze dell’uso del luppolo sia per scopo voluttuario che medicinale. Nel 1539 “Kreuterbuch”, Hieronymus Bock, scritto dal medico e predicatore Palatino, fu il primo ad affrontare l’aspetto dell’utilità del luppolo in campo ginecologico. L’infuso ottenuto dai coni risultò utile per il concepimento e per i disturbi della menopausa.

Prima della fine del diciassettesimo secolo nel libro delle piante “Herbal Book” era possibile trovare l’elenco della varietà dei suoi effetti benefici. Nel 1820 un farmacista di Parigi descrisse tutti gli effetti medicinali della pianta nel “Journal de Pharmacie”. A New York, nello stesso anno, il medico Ansel W. Ives esaminò le ghiandole dei coni e ne propose per la prima volta il nome di “Lupulin”. Nel 1876 Pasteur svolse studi sulla fermentazione aprendo così la strada allo studio sui batteri e lieviti della birra, caratterizzando le diverse fermentazioni dalle quali è possibile ottenere cultivar diverse di birra. Il re George III (1738-1820) risolse i propri problemi di insonnia ponendo i coni sotto il cuscino. Nel 1953 fu pubblicata la prima ricerca sulla proprietà estrogenica del luppolo da parte di Koch ed Heim infatti fu scoperto un fitoestrogeno che riproduceva la struttura degli ormoni femminili. Nello stesso anno si scoprì il suo utilizzo anche contro la Tubercolosi in quanto fu riscontrato che i lavoratori delle distillerie di birra mostravano una minor predisposizione a tale infezione. Si suppose che il termine Lupus (*Humulus lupulus* L.) potesse anche derivare dal nome latino “lupus” per la sua azione benefica che mostrava avere sul sintomo cutaneo (lupus) causato dalla tubercolosi. Con la Rivoluzione Industriale in Europa, oltre alla nascita di nuovi birrifici con macchinari sempre più specializzati, si ebbe anche lo sviluppo nel campo della ricerca scientifica e l’espansione nel settore dell’agricoltura. Nel ventesimo secolo la compagnia Blaes di Monaco mise in commercio la prima preparazione a base di luppolo e valeriana avente proprietà blando-sedative contro i disturbi legati al sonno. Nel 1984 la Commissione tedesca di Fitofarmaceutica E (German Federal Health Office) approvò *Humulus lupulus* L. come pianta farmaceutica. Dal quel momento si continuò a farne un utilizzo non solo nella medicina popolare, in campo alimentare, nella produzione di birra ma anche in ambito farmaceutico.

Un altro aspetto del luppolo è il suo utilizzo nella cucina popolare. I germogli apicali della pianta vengono raccolti in primavera e cucinati come l’asparago (lessati in acqua per 5-10 minuti) oppure aggiunti a risotti, pasta, frittate, minestre e quant’altro. La birra poi può essere aggiunta per la cottura della carne, patate e nella preparazione di dolci e biscotti. (Dr. Martin Biendl, Dr. Christoph Pinzl. Hops and Health.2008).

2.7- Composizione chimica del luppolo

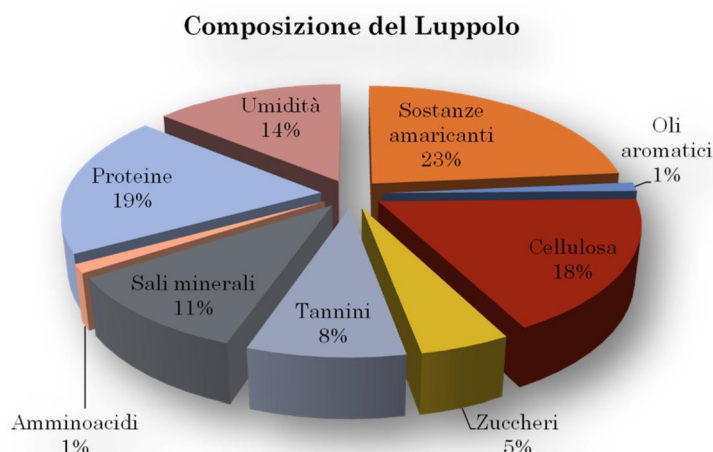


Figura 8-1 Composizione percentuale dei principali composti nei coni di *Humulus lupulus L.*

All'interno dei coni femminili sono state ritrovate più di 1000 sostanze chimiche. I principi attivi di maggior rilevanza sono contenuti nelle strutture ghiandolari per il 50-80%, il restante 15-30% nei coni. Ricordiamo che le piante di luppolo maschile contengono solo 10-15 ghiandole resinose rispetto alle 10.000 delle infiorescenze femminili. Le ghiandole resinose secernono un'oleoresina giallo-arancio, la lupolina (luppulina), ricca di metaboliti secondari. Le resine totali rappresentano la frazione del luppolo solubile sia in alcol (a freddo) che in etere. Sulla base della loro solubilità in solventi organici sono distinte in "soft resins" e "hard resins". Le soft resins, solubili in esano, idrocarburi paraffinici ed in etere di petrolio, comprendono gli alfa e beta-acidi; gli α -acidi precipitano come sale. Le hard resine comprendono prenilflavonoidi ed altri prodotti ossidativi. Le hard resins sono non solubili in idrocarburi paraffinici ed etere di petrolio e non si dissolvono durante il processo di ebollizione nella fase di preparazione della birra. Per questo motivo non sono richieste in alte concentrazioni nella birra in quanto danno un gusto troppo amaro, quasi tagliente. L'aumento del gusto amaro e la sensazione del tagliente delle hard resins è correlata alla lunghezza della catena dei polifenoli. Con il passare del tempo le resine morbide si ossidano in resine dure. Un'elevata concentrazione di hard resins indica che la pianta è vecchia o conservata a temperature maggiori di 5°C ed a contatto con l'aria e luce.

I metaboliti primari sono distribuiti in tutta la pianta: zuccheri (monosaccaridi, oligosaccaridi, pectine, emicellulosa e cellulosa), sali minerali, amminoacidi, lipidi, pectine e ammine. I metaboliti secondari li possiamo suddividere in tre grandi famiglie: acilfloroglucidi (resine amare o acidi amari) per il 15-30%, polifenoli 3-5% ed olii essenziali 0,2%-0,5%. Non solo nelle ghiandole ma anche nelle foglie si possono trovare flavonoidi prenilati, tannini e flavonoli glicosilati, in quanto anch'esse possiedono un piccolo numero di ghiandole.

- **Derivati Prenilati Acilfloroglucidi:** sono derivati prenilati del floroglucide, comunemente chiamati “sostanze amare o acidi amari”. Si dividono in due famiglie:
 α -acidi e β -acidi

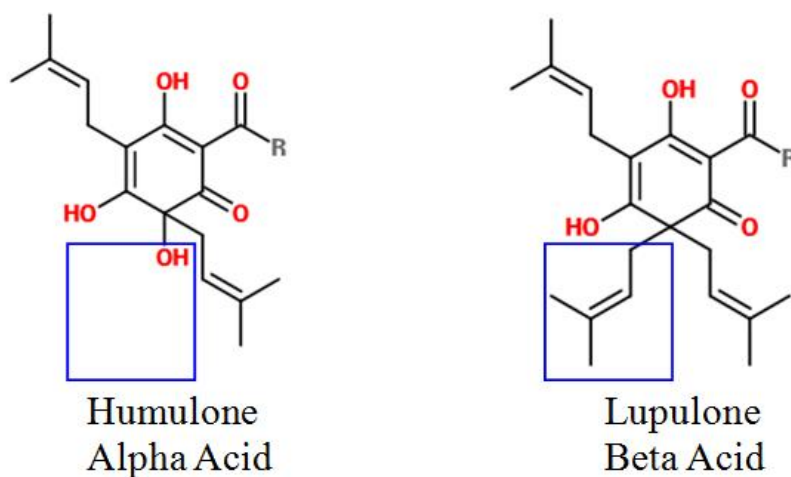


Figura 9-1 Strutture chimiche alpha e beta acidi. Alla sinistra è riportato lo scheletro base della classe dei umuloni; a destra è riportata la classe la struttura dei lupuloni.

Gli α -acidi (di-prenilati) o genericamente chiamati humuloni sono: humulone, coumulone, adumulone. (Denise De Keukeleire. Fundamentals of beer and hop chemistry. 23(1) 2000). La struttura chimica presenta la stessa ossatura ma si differenziano tra loro per un gruppo R a catena lineare. L'humulone ha $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, coumulone $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ed admulone $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{CH}_3$. Gli α -acidi hanno la tendenza ad isomerizzare ad alte temperature ed a pH basici, formando iso- α acidi con maggior spiccato gusto amaro. Nel processo della bollitura durante la preparazione della birra, ogni umulone dà origine a due epimeri iso-umulone: cis-isoumulone e trans-isoumulone, a seconda della disposizione spaziale

dell'alcool terziario in C4 e del gruppo prenile in C5. Questi prodotti ottenuti nel processo di bollitura conferiscono il gusto amaro alla birra. Nel corso del tempo le strutture cis- risultano più stabili ed amare delle trans- che deteriorano più velocemente. (C. Schonberger and T. Kostecky. Journal of the institute of brewing. Vol.117,3,2011). La ricerca di amarezza nella produzione della birra ha rilevato che gli iso-alfa acidi anche se il principale contributo nella birra è l'amarezza, non sono solo fonte di amaro ma hanno anche proprietà antibatteriche e stabilizzazione del sapore amaro, inibendo lo sviluppo di sapore stantio. Il coumulone è l' α -acido più importante sul quale si basano le analisi qualitative della birra per la caratteristica di essere più polare ed avere una maggior solubilità in acqua. (Denise De Keukeleire. Fundamentals of beer and hop chemistry. 23(1) 2000.) Infatti le birre si dividono in: aromatiche se i valori di coumulone sono inferiori al 30% sul totale degli α -acidi (luppolo da aroma) ed in amare tendenzialmente tagliente ed aspre, se il valore è superiore al 30%.

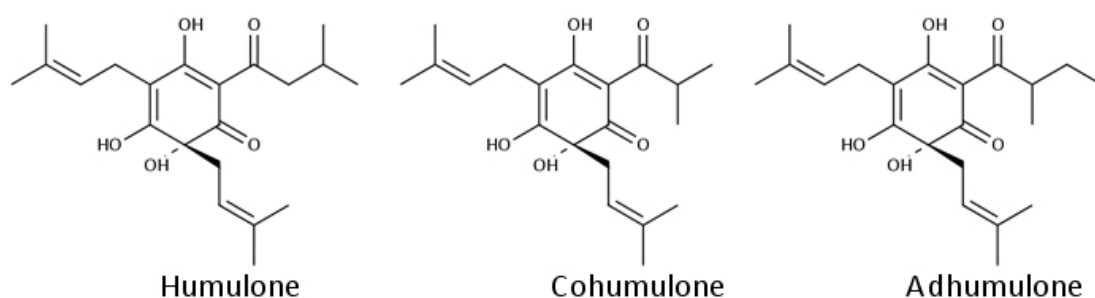


Figura 10-1 Strutture chimiche della classe dei umuloni. 1-Umulone. 2-Coumulone. 3-Admulone.

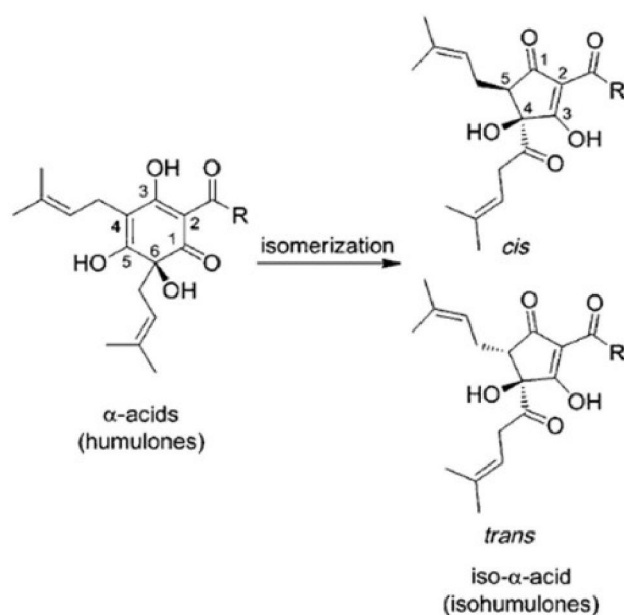


Figura 11.1 Isomero *cis-trans*-dell'umulone.

I β -acidi (tri-prenilati), ovvero la famiglia dei lupuloni, sono composti da: lupulone, colupulone ed adlupulone, aventi una struttura comune ma si differenziano per un gruppo sostituito R a catena lineare. Lupulone $-\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$, colupulone $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ed adlupulone $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$. I β -acidi hanno meno potenzialità acide degli α perché il gruppo funzionale dell'alcool terziario è stato sostituito con un altro gruppo prenilato. Anche i β -acidi isomerizzano dando origine a forme *cis*- e *trans*-. In più sono estremamente sensibili all'ossidazione a contatto con l'aria (auto-ossidazione) attraverso la quale si ottiene l'umulone. Sono molto importanti per la conservazione.

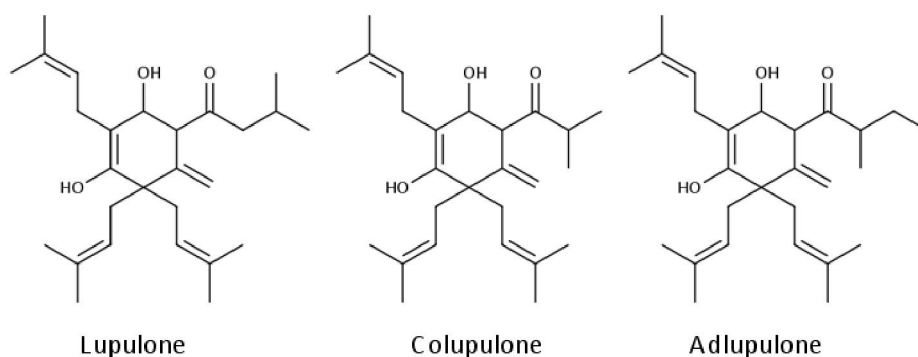


Figura 12-1 Struttura chimica della classe dei lupuloni. 1-Lupulone. 2-Colupulone. 3-Aslupulone.

- **Prenil Flavonoidi:** sono una sotto classe di flavonoidi distinguibili dal gruppo prenil. Si suppone che il gruppo idrofobico (prenile) faciliti l'attaccamento alle membrane cellulari, perciò la prenilazione può aumentare il potenziale di attività del flavonoide originale. Lo xantumolo (3'- [3,3-dimetil allil] -2',4',4-triidrossil-6'-metossil calcone) o XN è il principale prenil flavonoide o calcone prenilato delle infiorescenze femminili, molto importante per le sue molteplici proprietà terapeutiche ed utilizzo nella birra. Lo xantumolo metabolizza spontaneamente in un suo isomero, isoxantumolo o IX.

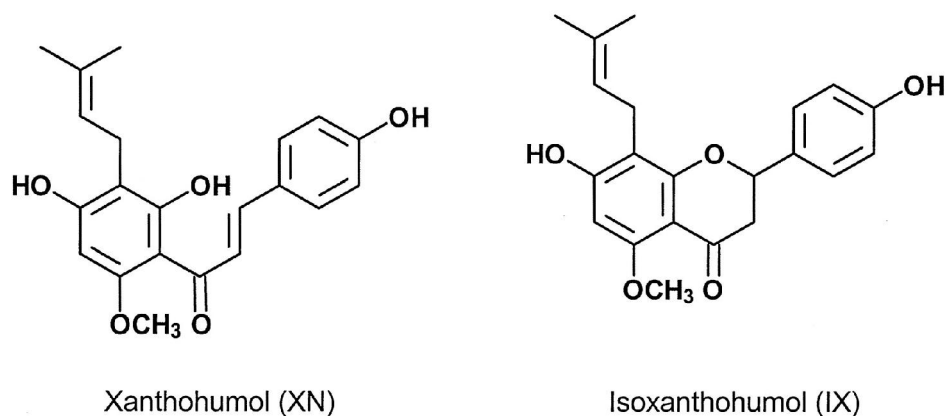


Figura 13-1 *Struttura chimica del principale polifenolo e del suo isomero.*

Il desmetilxantumolo, tradizionalmente chiamato 3'-prenilnaringenina calcone, isomerizza spontaneamente durante il processo di estrazione a 8PN (8-prenilnaringenina) + 6PN (6-prenilnaringenina). 8PN deriva dalla naringenina, aglicone del glucoside flavonoide naringina (prodotto naturale con una configurazione S dello stereocentro in C2). Anche lo xantumolo può ciclizzare a 8PN in quanto viene demetilato nella flora batterica intestinale.

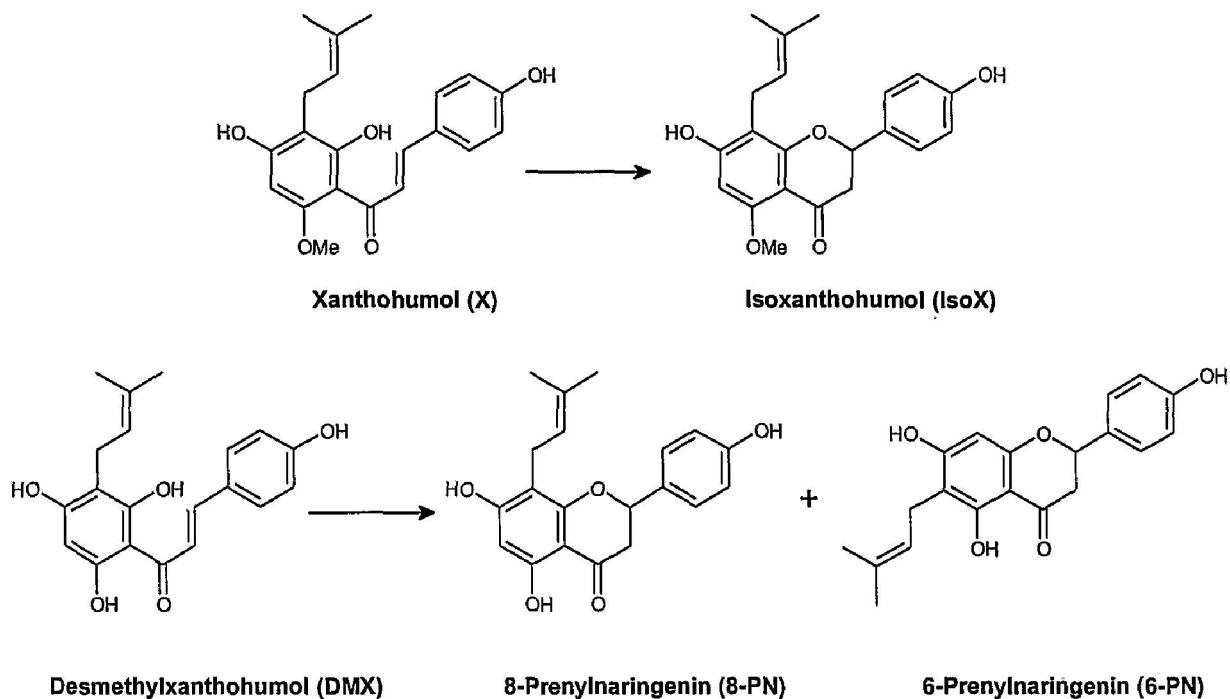


Figura 14-1 Strutture isomeriche dei composti polifenolici.

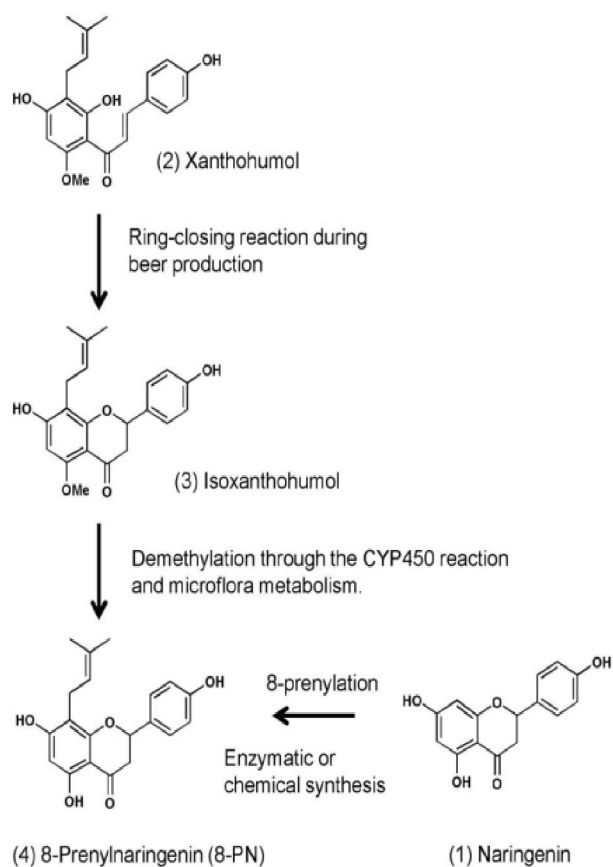


Figura 15-1 Sintesi del composto 8-prenilnaringenina (8-PN) a partire dallo xantumolo.

- **Flavonoli Glicosilati:** sono una sotto classe dei flavonoidi, derivanti dal benzo- γ -pirone. Generalmente formati da due anelli aromatici (A e B) e da un eterociclo di collegamento ©; in base al tipo di eterociclo ed ai suoi sostituenti, i flavonoidi si suddividono in varie classi.

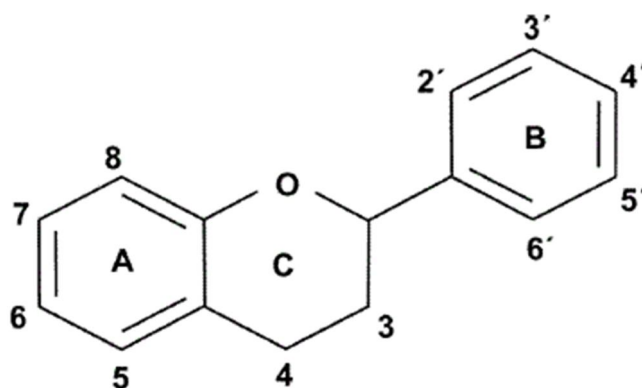


Figura 16.1 *Struttura generale dei flavonoli.*

I flavonoli, conosciuti anche come antoxantine, caratterizzati da un eterociclo di tipo γ -pirone. In molti casi sono glicosilati sul gruppo ossidrilico in posizione 3. Si dividono in mono-glicosidi e diglicosidi. I più comuni sono kamferolo, quercetina, rutina ed astragalina. I polifenoli possono contribuire al gusto amaro ed astringente, questo dipende dal loro grado di polimerizzazione. Recenti studi hanno mostrato che l'amaro dei polifenoli interagisce con l'amaro degli iso-alfa acidi nella birra. 10mg di iso-alfa acidi sono stati combinati con altri 100mg o 200 mg/L di polifenoli. Fu scoperto che l'aggiunta di polifenoli in queste concentrazioni incrementava l'intensità di amaro ed anche i risultati di gusto astringente. È stato considerato che le birre con 200 mg/L di polifenoli sono più amare di quelle con 10 mg/L di iso-alfa acidi. (C. Schonberger and T. Kostecky. Journal of the institute of brewing. Vol.117,3,2011).

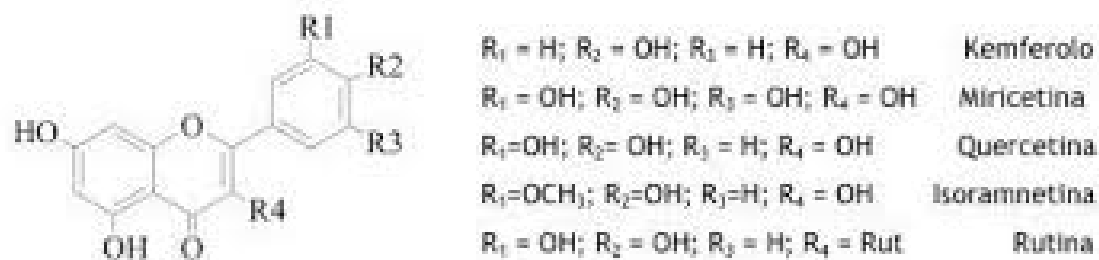


Figura 17-1 *Principali flavonoli presenti nelle ghiandole di Humulus lupulus.*

- **I tannini:** non rappresentano una vera e propria classe di composti ma piuttosto una miscela di sostanze polifenoliche i cui componenti principali sono antociani, leucoantociani, flavonoli e catechine. Questa miscela è solubile in acqua ed ha la capacità di promuovere la formazione di complessi tra proteine e sostanze amare. Vi è quindi un effetto stabilizzante.

- **Olii Essenziali:** rappresentano la parte volatile dei principi attivi e la classe con più componenti; ne sono stati identificati più di 100/200. Si dividono a loro volta in due grandi sottogruppi: quella degli idrocarburi e dei composti ossigenati. Gli idrocarburi (terpeni) sono classificati: in idrocarburi alifatici (ad esempio n-pentano, n-ottano, isoprene...), monoterpeni aciclici (come mircene, pinene, ocimene e limonene) e monoterpeni monociclici (limonene e fellandreni). Gli idrocarburi sono altamente volatili e quindi raramente presenti dopo il processo di bollitura nella birra. Il mircene rappresenta il composto più presente negli olii essenziali e ne ritroviamo di più in percentuale nei luppoli cosiddetti “amaricanti” ovvero che contengono un contenuto di alfa-acido superiore al 10%. Nella fase di bollitura il mircene forma altri composti aromatici come linalolo e geraniolo. I monoterpeni idrocarburi sono la classe di composti più aromatici ed i primi che si attivano in risposta ad un attacco viroide.

Negli idrocarburi idrogenati troviamo anche i sesquiterpeni (humulene, cariofillene, selinene e farnesene) e triterpeni. L'humulene viene descritto come un sentore delicato, raffinato ed elegante; si riscontra nei cosiddetti luppoli aromatici. Anche i sesquiterpeni idrogenati non sopravvivono alla fase di bollitura del luppolo ma ritroviamo i loro composti di ossidazione e degradazione come gli epossidi di humulene. Il cariofillene e farnesene, anch'essi idrocarburi aromatici sono presenti in piccole quantità sul contenuto totale di olii essenziali. Appartengono invece al gruppo dei composti ossigenati: alcoli alifatici (esempio metil alcool, isopentil alcool, ecc...), alcoli terpenici (come linalolo, geraniolo, umunelolo, ecc...). Fra i composti ossigenati abbiamo anche chetoni alifatici, aldeidi alifatiche aldeidi terpeniche, esteri ed epossidi. Gli idrocarburi ossigenati derivano dalla combinazione in fase di bollitura con l'ossigeno e gli idrocarburi iniziali. I più importanti idrocarburi ossigenati presenti nella birra sono l'humulene epossido II e cariofillene epossido. Infine la parte volatile contiene anche componenti con lo zolfo, come i tioesteri. La classe degli olii essenziali conferisce alla birra il gusto e l'aroma.

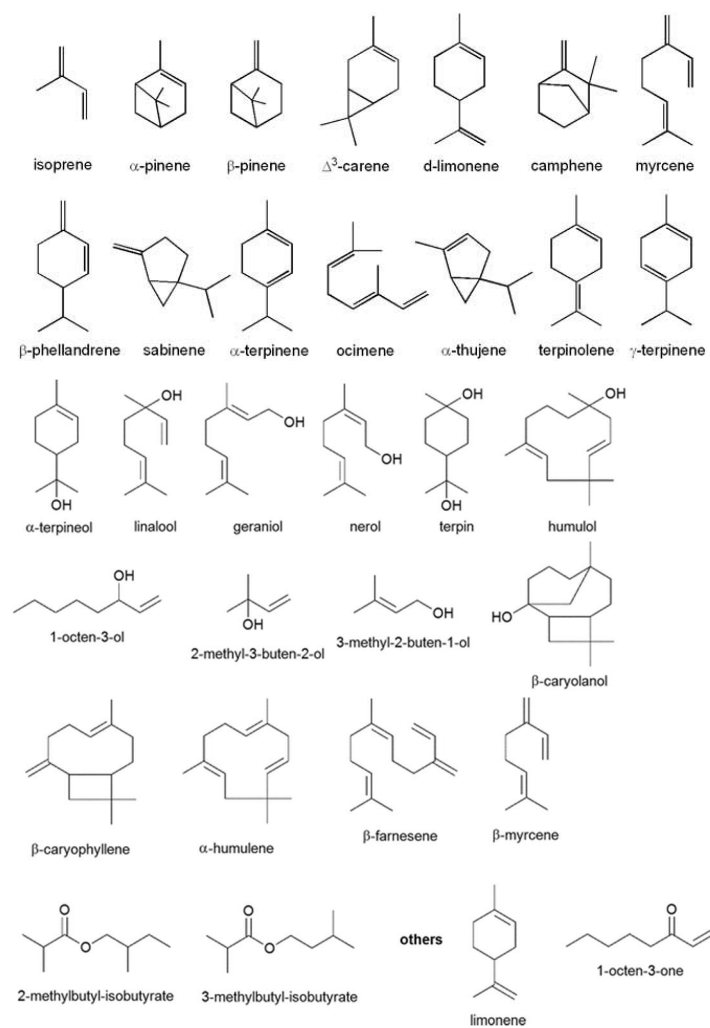


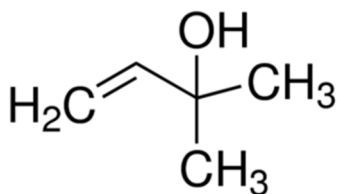
Figura 18-1 Strutture dei componenti presenti nell' olio essenziale di *Humulus lupulus*.

2.8- Attività Farmacologica

Il luppolo è stato riconosciuto come fitomedicina, in quanto è stato inserito nel 1984 nella monografia delle piante fitofarmaceutiche da parte della Commissione E. e dall'Ufficio della Salute della Federazione Tedesca. Negli ultimi sono state pubblicate le monografie ESCOP (Cooperazione Scientifica Europea sulla Fitoterapia) in continuo aggiornamento. Qui sono descritte le proprietà anti-infiammatorie, anti-ossidanti, sedative, estrogeniche del luppolo.

- Attività blando- sedativa

L'attività blando-sedativa è quella con più radici storiche, infatti si narra che i lavoratori delle vecchie fabbriche, trattando il luppolo, accusavano sonnolenza. Da qui era usanza raccogliere i coni del luppolo e disporli all'interno del cuscino, in modo da stabilire un contatto diretto, costante e continuativo nelle fasi del sonno grazie all'effetto soporifero e calmante che favorirebbe la naturale insorgenza del



sonno. Il primo esperimento fu applicato su ratti e topi nel 1980 da parte di R. Hänsel e Coll (Hänsel e Wagener, 1967; Stocker, 1967), i quali studiarono l'effetto farmacologico di un composto alifatico a 5

atomi di carbonio, 2metil-3buten-2olo. (R. Wohlfart et al., 1983). Il composto si viene a formare durante il processo di stoccaggio dell'umulone e lupulone, per auto-ossidazione (prodotto di degradazione degli acidi amari). La concentrazione di questo composto aumenta nel corso del tempo fino a raggiungere una concentrazione di circa 0,15% dopo 2 anni. (R. Wohlfart, R. Hänsel e Coll. *Planta Med.* 1983). Esiste una monografia positiva sull'utilizzo del luppolo per i disturbi del sonno da parte della Commissione E tedesca, come esistono una serie di studi clinici positivi effettuati su combinazioni di estratti di luppolo- valeriana. (Koetter et Al., 2007). È stato suggerito che l'azione sedativa del composto sia mediata dal recettore della melatonina. (Butterweck et Al., 2007).

Proprietà Farmacologica: calmante, induttore del sonno, blando narcotico.

Utilizzato in caso di stati di agitazione, disturbi del sonno, insonnia, disturbi d'ansia.

Interazioni: associato con altri sedativi provoca un effetto di sinergismo positivo con attività antidepressiva ed anticonvulsivante.

Modalità d'azione: interferisce con il sistema GABAergico, riducendo il neurotrasmettitore nel SNC.

Controindicazioni ed effetti collaterali: nessuno.

Prodotti in commercio: cuscini con all'interno ghiandole di luppolo essiccato.

Bagni con coni di luppolo fresco.

Preparazioni Galeniche: come tisane, infusi, decotti, sciroppi, estratti fluidi, capsule e compresse, ottenute dall'estratto secco con l'aggiunta di Valeriana e/o Biancospino e/o Melissa ed additivi.

Posologia: $\frac{1}{2}$ (circa 0,4-0,5g) cucchiaini da the di coni di luppolo. Vengono infusi in acqua calda (circa 150ml) per 10-15 lasciare ad infusione. Infine filtrare.

Somministrare 2/3 volte al giorno. (R. Wohlfart, R. Hänsel e Coll. Planta Med.

1983). In Germania si trovano 70 specialità sedative (Hovaletten, Hova Nervenruch forte, Baldriparan, Somnivis, Visnal) è presente anche nel formulario nazionale Italiano della FU IX per la specie composta con la valeriana.



Figura 19-1 Pubblicità preparazioni a base di *Humulus lupulus* con altre piante ad azione sedativa.

- **Attività anti-ossidante**

L'attività anti-ossidante dei flavonoidi, tra cui lo xantumolo è il maggior rappresentante, ha la funzione di eliminare i radicali dell'ossigeno e gruppi nitro. Il calcione xantumolo mostra elevata azione antiossidante in *vitro*, superiore a quella della vitamina C. Queste osservazioni hanno portato allo sviluppo di "birre salutistiche" a elevata concentrazione di xantumolo. (Engles, 2006). La stessa azione è svolta dall'humulone che inibisce il perossido di idrogeno nel processo di ossidazione delle lipoproteine.

- **Proprietà anti-batterica**

La proprietà anti-batterica è data dagli acidi amari (acilfluoroglucidi). Fin dall'antico Egitto il luppolo svolgeva la funzione di conservante del cibo e nel corso degli anni ha assunto la proprietà di stabilizzante della birra e della schiuma. Gli acidi amari hanno la capacità di azzerare la contaminazione batterica inibendo la crescita dei microrganismi. Sono batteriostatici e battericidi verso batteri gram positivi (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Micrococcus*). Lupolone, umulone ed isoumulone causano la lesione della parete della membrana citoplasmatica, alterando l'attività di trasporto di zuccheri ed amminoacidi, inibendo così la respirazione cellulare e la sintesi di proteine, RNA e DNA. L'attività degli acidi amari aumenta con valori bassi di pH perché incrementa il cambiamento di permeabilità delle membrane cellulari. Nel 1949, attraverso studi in *vitro*, fu scoperto che gli acidi amari sopprimono lo sviluppo di lesioni nei polmoni causati dal *Mycobacterium tuberculosis*. In seguito alla somministrazione intramuscolo di lupulone (5/6g al giorno per 3mesi) fu evidenziata la riduzione dello sviluppo della tubercolosi. (Marjan Van Cleemput, Ko Cattoor, et Al., 2008).

- Attività anti-tumorale e chemio-preventiva

Un'altra proprietà del luppolo è quella anti-proliferativa ed anti-angiogenetica portando all'induzione all'apoptosi (morte programmata delle cellule) con disgregazione della membrana mitocondriale in seguito all'alterazione della permeabilità di membrana e delle proteine Bcl-2. Tale fenomeno causa l'attivazione della risposta delle caspasi. Sono stati effettuati studi in *vitro*, nei quali è stato potuto osservare l'induzione d'espressione degli enzimi CYP450 (enzimi detossificanti di xenobiotici) in particolare nel fegato. Da studi in *vitro* è stato evidenziato che la somministrazione di 1mg per peso corporeo di umulone, riduce l'espressione di cellule cancerogene del colon. Nel corso degli anni si è focalizzata l'attenzione sulle potenzialità anti-tumorali e chemio-preventiva dello xanthumolo: infatti sembra promuovere l'apoptosi, non solo delle cellule sane, ma anche quelle malate inibendo l'insorgenza di cellule tumorali, la formazione di metastasi e la proliferazione di cellule cancerogene (carcinoma mammario, ovarico e colon). (Jan F. Stevens, Jonathan E. Page. 2004). Miranda et Al (1999) dimostrarono che lo xanthumolo non mostra una tossicità per le cellule del fegato né l'inibizione della fosforilazione ossidativa nel processo di respirazione mitocondriale isolati di ratto in concentrazioni di luppolo circa 10 μ M o inferiori. Questi effetti chemopreventivi ad ampio spettro dello xanthumolo hanno portato allo sviluppo di birre sperimentali con alti livelli di flavonoidi.

- Attività pro-estrogenica



Figura 20-1 *Dipinto di una donna che raccoglie le piante di luppolo che crescono selvatiche.*

Nel 1953 Koch e Heim in seguito alla leggenda popolare che le donne che vivevano a poca distanza dai giardini dei luppoli e lavoravano alla raccolta degli strobili, nei giorni successivi mostravano la comparsa del ciclo mestruale come effetto collaterale. Koch e Heim svolsero un test in vivo con femmine di roditore castrate; tale studio evidenziò risultati come iperplasia dell'epitelio vaginale, ipertrofia, secrezione a livello della ghiandola mammaria. Nel 1972 Nastainczyk isolò un componente "pro-estrogenico" ed osservò che il composto isomerizzava in un mix che chiamò "luppolo-estrogeno". Nel 1985 Hänsel e Schulz riportarono la struttura chimica del composto precedentemente scoperto: desmetilxantumolo (DMX), precursore del sinonimo della 3'-prenilnaringenina (calcone). Nel luppolo il principale estrogeno è la miscela racemica 1:1 formata da 8-prenilnaringenina e 6-prenilnaringenina, isomeri del. Nel 1999 Milligan e Coll. isolarono l'8PN ed affermarono esser il più importante fito-estrogeno nel luppolo. 8PN ha una struttura simile all'ormone endogeno 17β estradiolo. Tale composto è capace di legarsi alle isoforme del recettore estrogenico $ER\alpha$ e $ER\beta$ (recettori ormonali specifici per gli estrogeni).

L'8PN è un'agonista più debole dei recettori estrogenici β (ER β) rispetto ai recettori estrogenici α (ER α). La presenza del gruppo prenile, ovvero la catena laterale $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-CH=C(CH}_3)_2$ in posizione C8 del 8PN si traduce in un'affinità maggiore per il recettore degli estrogeni, rispetto alla 6-prenilnaringenina, probabilmente come risultato di una interazione idrofobica sito-specifica. Attualmente 8PN è utilizzata per il trattamento della menopausa, riduce le vampate di calore, aumenta la produzione di ormoni, previene l'osteoporosi e migliora la secchezza vaginale. Nei testi OMS e ESCOP sono riportati studi *in vitro* sull'attività estrogenica di 8-PN. (Milligan et Al., 1999. 2000).

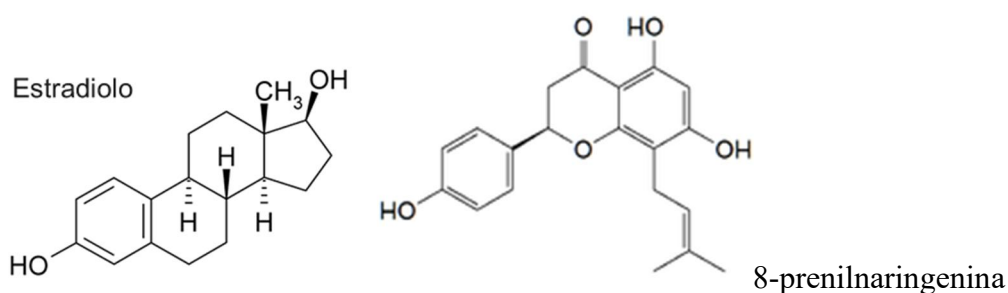


Figura 21-1 Struttura chimica estradiolo e 8-prenilnaringenina.

- stimolante la secrezione del succo gastrico:

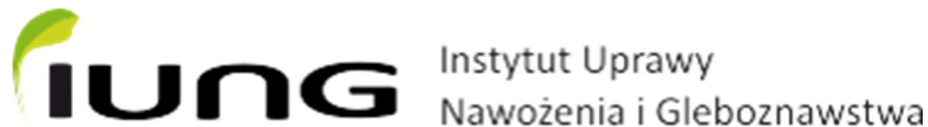
Il luppolo, grazie alle sostanze amare (acidi amari), può essere utilizzato contro la dispepsia, mancanza dell'appetito, blando stomachico e digestivo. Già citato da Paracelso e nei “discorsi” di Mattioli come rimedio per disturbi di stomaco e del fegato. Anche la *British Herbal Pharmacopoeia* e la monografia WHO del luppolo riportano l'indicazione riferita a dispepsia ed alla mancanza di appetito. (Evans, 1989).

- **Controindicazioni o effetti indesiderati:**

Il suo uso sembra essere privo di tossicità. Non sono noti effetti collaterali rilevanti a seguito di trattamento con dosi terapeutiche. Le segnalazioni di effetti avversi si riferiscono alla possibilità che, in individui sensibili, l'inalazione ed il contatto cutaneo diretto con la droga, continuo per un tempo prolungato, possa causare la sindrome “del raccoglitore”, caratterizzata da mal di testa, sonnolenza e congiuntivite e dermatiti allergiche. (Meznar e Kajba, 1990). Si sconsiglia l'uso del luppolo in gravidanza e durante l'allattamento in seguito all'assenza di studi di tossicità per questa categoria di persone. In ogni caso viene consigliato di prestare particolare attenzione qualora il luppolo venga associato a farmaci ad azione antidepressiva (es. triciclici), sedativa (es. benzodiazepine) e barbiturici.

3- Coltivazioni di luppolo in Polonia

3.1- Istituto di Scienze del Suolo e della Coltivazione delle Piante (IUNG)



Le coltivazioni del luppolo in Polonia occupano un'area di circa 2.200 ettari. La produzione di coni di luppolo ha raggiunto un livello di 3.100- 3.500 tonnellate all'anno, mentre quelle degli α -acidi circa 230-260 tonnellate. La Polonia occupa il quinto posto nel mondo ed il terzo in Europa per superficie in acri e produzione di luppolo crudo (secco, grezzo). Lo IUNG (Institute of Soil Science and Plant Cultivation) cioè Istituto di Scienza del Suolo e della Coltivazione delle Piante, è un Istituto di Ricerca Statale situato a Pulawy, dove ho svolto parte della mia tesi di laurea, ha contribuito allo sviluppo delle coltivazioni di luppolo in Polonia. Il centro si occupa della coltivazione di nuove specie di luppolo, una miglior resa agronomica, coltivazioni tecnologiche e miglioramento genetico con la tetraploidia. Il programma di coltivazione del luppolo nacque nel 1946. Inizialmente furono introdotte dieci coltivazioni originali di luppolo: Lubelski, Nadwiślański, Estera, Marynka, Izabella, Oktawia, Sybilla, Zbyszko, Iunga, Magnat, Pulawy e Zula. Un ulteriore incremento della qualità dei luppoli fu possibile grazie all'attacco di virus e piante libere da viroidi latenti di luppolo in quanto il *virus del mosaico del luppolo* (HpMV), *virus del mosaico della mela* (ApMV) ed il *viroide latente del luppolo* (HLVd) vengono comunemente rilevati nelle piante di tutte le coltivazioni prodotte commercialmente in Polonia. Il programma di produzione di piante sane è iniziato nel 2004 ed include sei esempi di coltivazione di luppoli: Lubelski, Magnum, Marynka e Sybilla, (comunemente coltivate in Polonia) mentre le altre due: Magnat e Pulawski sono nuove culture prodotte in IUNG-PIB.

Tali piante, libere da agenti patogeni sono state ottenute usando le biotecnologie vegetali come il metodo della rigenerazione attraverso i meristemi apicali in culture in vitro. L'istituto ha raggiunto la coltivazione di più di 330.000 piante in un'area approssimativamente di circa 150 ettari. (Monika Agacka, Dr. Urszula Skomra, Dr. Mieczysław Stasiak. Polish hop cultivars. 2010).

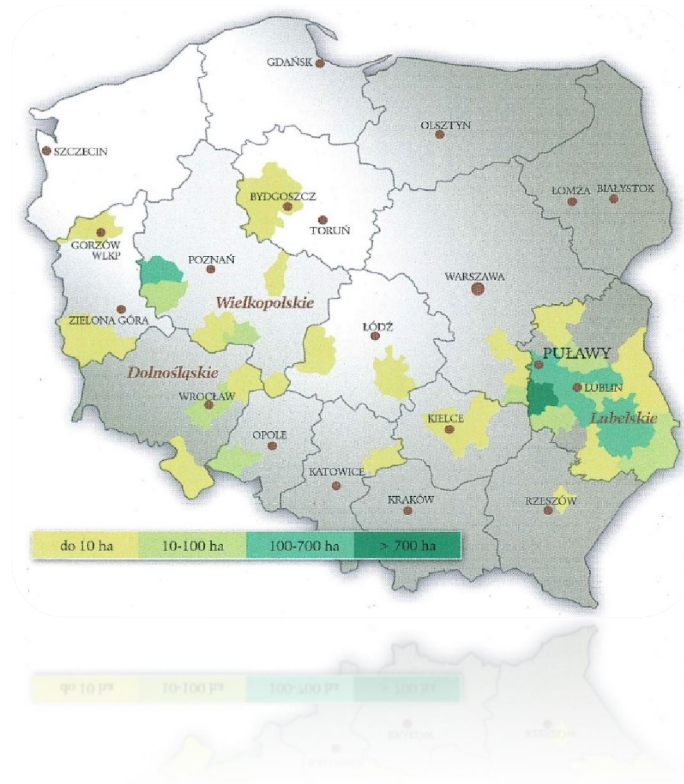


Figura 1-2 Coltivazioni di luppolo nella regione Lubelskie in Polonia.

3.2- Virus e viroide nel luppolo

Con il termine virus, si intendono quelle entità di modestissime dimensioni, di natura nucleoproteica, incapaci di riprodursi autonomamente al di fuori delle cellule viventi. Sono agenti capaci di scatenare malattie ad alto grado di infettività o lieve. Dal punto di vista chimico la loro composizione è formata da proteine ed acidi nucleici. I virus possono essere suddivisi in base allo zucchero pentoso (riboso o desossiriboso) ed alla forma (a particella sferica, ellissoidale, bastoncelliformi, filiformi o flessuosi). Le dimensioni variano tra pochi micron ed alcune centinaia di mμ. La sintomatologia nel caso delle pinete di luppolo si evidenzia in sintomi esterni sul lembo fogliare: maculature di verde più pallido, ingiallimento e distruzione dei cloroplasti. Le vie di trasmissione sono molteplici (per via aerea, per polline, per seme, per leggero sfregamento o attraverso vettori animali). Esistono vari criteri di intervento per la distruzione e soppressione delle virose (coltivazione delle piante sane in ambienti distanti, interventi con mezzi chimici, selezione agronomica infine la coltura dei meristemi).

La tabella riporta i tre principali agenti infettivi del luppolo ed i relativi effetti sulla pianta.

Agente Patogeno	Sintomi	Effetti sulla composizione chimica
virus mosaico del luppolo HpMV	maculature più o meno consistenti di un verde più pallido, ingiallimento diffuso e distruzione dei cloroplasti, sul lembo fogliare.	riduzione del contenuto degli α -acidi del 18%
virus mosaico della mela ApMV		riduzione del contenuto degli α -acidi del 10%
viroide latente del luppolo HLVd		riduzione del contenuto degli α -acidi del 40% riduzione del contenuto degli oli essenziali del 13-29% crescita del contenuto di componenti indesiderati 29-41%

Tabella 1-2 Effetti della presenza di virus e viroidi nel luppolo.



La distribuzione geografica dei virus e viroidi è comune in Europa e negli Stati Uniti.

Il virus HpMV fa parte del genere *Carlavirus*.

Essi si trasmettono

meccanicamente da apparecchiature agricole e solitamente in modo non persistente da parte di afidi (insetti parassiti emitteri). Il suo genoma è un singolo filamento di RNA, ha dimensioni di circa da 651 nm ed il genoma incapsulato consiste in circa 8.800 nucleotidi con una massa molecolare di circa 34,1 kDa. Generalmente è asintomatico, ma talvolta è possibile osservare delle bande chiare giallastre lungo le vene principali delle

foglie ed i margini ricurvi verso il basso. Le piante infette tendono facilmente a cadere e producono solo un piccolo numero di coni. Il virus ApMV fa parte del genere *Ilarvirus*; il suo genoma ha una struttura a RNA a singolo filamento lineare ed il capsido è privo di involucro. Esistono varie specie di virus del mosaico della mela aventi un numero diverso di nucleotidi. Le piante infettate mostrano sintomi evidenti di clorosi sulla superficie delle foglie che può tendere a necrosi. Il virus si diffonde attraverso l'innesto delle radici. Il viroide HLVd possiede un singolo filamento circolare di RNA. (Sarah J. Pethybridge and frank S. Hay et Al. Plant Disease. Vol. 92 No. 3.2008). La trasmissione meccanica avviene durante le operazioni di coltivazione e raccolta ed i sintomi si possono riscontrare nel colore giallo alla base delle foglie mentre la parte restante è clorotica. È opportuno sottolineare che virus e viroidi del luppolo possono essere responsabili di una riduzione della resa nella composizione dei metaboliti secondari ed una diminuzione del numero di coni. (Urszula Skomra et Al. Content and composition of bitter acids and essential oil in hop plants free from viruses and Hop latent viroid. 2012).

3.3- Come eliminare virus e viroidi dal luppolo



Figura 2-2 *Meristemi del luppolo.*

Al momento che la pianta viene infestata dal virus o viroide si diffonde nell'intera pianta ad eccezione del meristema. Infatti il meristema è un tessuto vegetale in cui le cellule hanno la capacità di crescita continua. Ad ogni processo di mitosi, le nuove cellule meristematiche sono molto piccole e prive di vacuoli; con la maturazione assumeranno forme e strutture in relazione alla specifica

funzione. Posso essere paragonate alle nostre cellule staminali, cellule perenni giovani. I meristemi sono localizzati in più parti della pianta, quelli apicali all'estremità del fusto a livello dei nodi nelle gemme ascellari, mentre quelli distali si ritrovano nelle radici laterali. Per questo motivo vengono sfruttati i meristemi apicali, basandosi sul presupposto che le cellule che sono piccole e in rapida divisione, saranno quindi meno colonizzate da virus e viroidi. Il metodo della coltura dei meristemi sfrutta l'assenza di virus nell'apice vegetativo prelevando un apice vegetativo di una pianta virosata ed allevarlo in coltura artificiale da cui si otterrà l'intera pianta risanata.

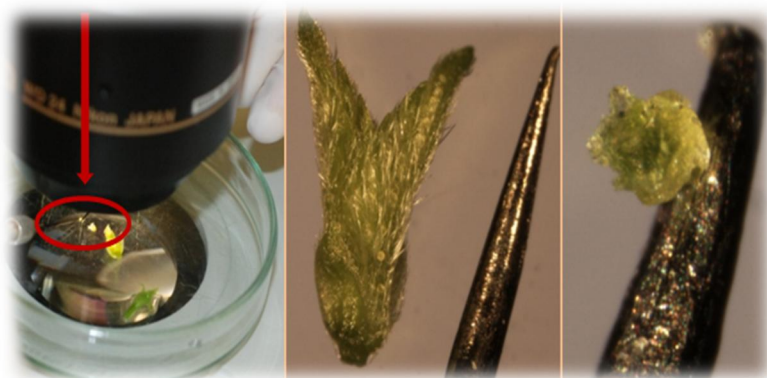


Figura 3-2 Isolamento meristemi di luppolo.

Inizialmente vengono selezionate le piante con maggior vigore, rimossi i meristemi, lavati con l'acqua e sterilizzati con una soluzione di sodio ipoclorito al 6% per 5 minuti ed infine risciacquati con acqua

distillata sterile. Per l'isolamento occorre utilizzare a pinze, bisturi e microscopio ottico per separare i meristemi apicali dai germogli (rami, diramazioni) laterali date le piccolissime dimensioni 0.1-0.2 mm. (Urszula Skomra, et Al. Improvement of Polish hop cultivars by elimination of viruses and Hop latent viroid using in vitro cultures). La crescita dei meristemi avviene in culture *in vitro*, posti in una camera di crescita in condizioni controllate di temperatura (24°C) ed illuminazione per un periodo costante di 16 ore.



Figura 4-2 Impianti di micropropagazione e radicazione dei meristemi di luppolo.

Dopo cinque settimane è possibile riscontrare quali sono i meristemi superstiti che potranno essere trasferiti, dopo 14 giorni, in impianti di micropropagazione e radicazione ricoperti da cappucci di plastica, atti a garantire il processo di climatizzazione.



Figura 5-2 *Terreni di coltura di meristemi di luppolo.*

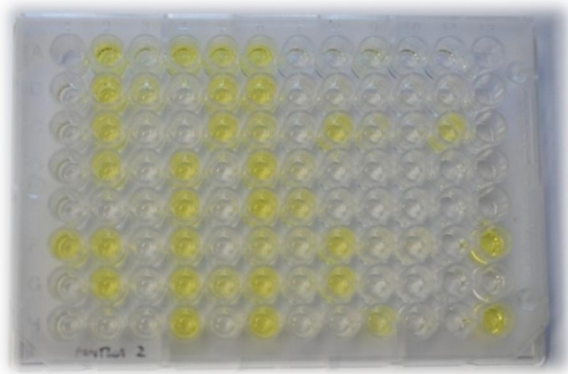
Raggiunta una lunghezza sufficiente del gambo (radice) di circa 15 mm, dopo due settimane circa, le piante che hanno sviluppato le radici delle piante sono nuovamente piantate in vasi (8x8cm) con terreno e trasportate nelle serre. I terreni di coltura sono ricchi di vitamine, minerali ed ormoni, necessari per la crescita e la sopravvivenza.



Figura 6-2 *Piante di luppolo pronte per il pre-impianto in campi.*

Solo dopo 6/ 8 settimane (dipende dalle condizioni di crescita) le piante potranno essere impiantate (interrate) in campi sia al momento dell'isolamento che dopo tre mesi dalla rigenerazione in terreni di coltura, devono essere effettuati i test di diagnosi per la presenza dei virus. Le metodiche utilizzate sono il test ELISA per i virus e RT-PCR per i viroidi. Solo le piante con test negativo saranno ulteriormente sfruttate per la propagazione nelle serre. (Karolina Kurska, et Al. The effect of explant size on regeneration and elimination of viruses and hop latent viroid from hop.)

Identificazione del virus utilizzando il metodo ELISA



- ◆ virus presenti nell'impianto- infetti.
- ◇ assenza di virus nell'impianto- sani.

Figura 7-2 Test *ELISA* su piante di luppolo.

Il test ELISA (acronimo di Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) saggio immuno-assorbente legato ad un enzima. È un saggio immunoenzimatico usato per verificare la presenza o meno di un antigene, usando anticorpi ai quali è legato un enzima. Durante l'analisi l'antigene si lega con un anticorpo marcato da un enzima e viene rilevato grazie all'aggiunta di un substrato per l'enzima che produce un cambiamento di colore. La risposta finale è insita nel cambiamento di colore della soluzione del pozzetto che viene misurato da uno spettrofotometro (lo strumento misura la quantità di luce che passa attraverso i pozzetti ed il substrato). Si tratta di un saggio in fase solida effettuato su piastre da microdosaggio.

Identificazione del viroide mediante il metodo RT-PCR

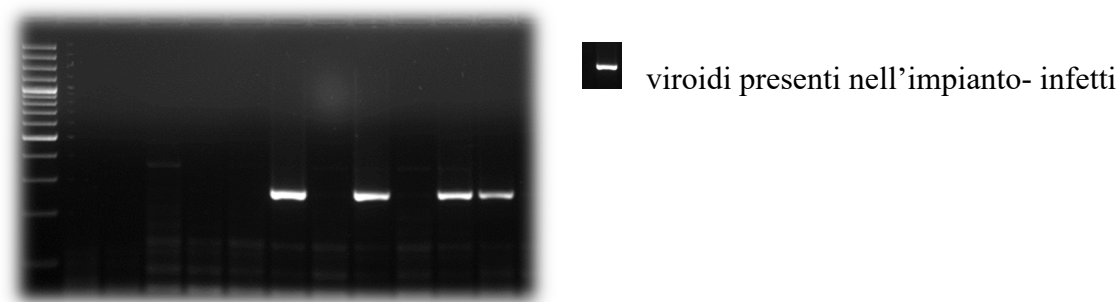


Figura 8-2 Test RT-PCR su piante di luppolo.

Reazione a catena della polimerasi in tempo reale. È un metodo di amplificazione degli acidi nucleici svolto *in vitro*, che permette la sintesi di nuovi filamenti a partire da un filamento tipo di DNA, utilizzando l'enzima DNA-polimerasi. Per poter quantificare il prodotto di sintesi di DNA ad ogni ciclo di amplificazione, viene usata la fluorescenza emessa da coloranti fluorescenti in grado di legarsi alle molecole di DNA prodotte ad ogni ciclo di amplificazione. Dal momento dell'inserimento in terreni di coltura, le nuove piante di luppolo dovranno esser sottoposte per tre anni a test (ELISA e RT-PCR). In tale periodo le piante di luppolo libere da virus e viroidi crescono a distanza dagli altri giardini di coltivazione di piante di luppolo non attaccate da virus. Le coltivazioni *in vitro* dei meristemi ha avuto successo nell'eliminazione di entrambi i virus oltre al viroide HLVd. Tutte le piante rigenerate da meristemi di "piante madri" saranno libere dai virus HpMV e ApMV, mentre solo alcune di loro sono libere dall'HLVd. In Polonia, dal 2013, sono state ottenute "piante madri" tutte sane per ciascuna coltivazione commerciale di luppolo. Più di 10.000 piante di luppolo libere da virus e viroidi sono prodotte e rilasciate ai coltivatori.

4- Materiali e Metodi

4.1- Strumentazione generale

4.1.1- HPLC



Figura 1-3 HPLC

HPLC (high performance liquid chromatography) cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni, rappresenta l'evoluzione strumentale della cromatografia su colonna a bassa pressione. È un metodo analitico specifico per la determinazione degli α - e β - acidi di tutte le specie di luppolo. La separazione dei vari componenti, avviene tramite le interazioni che si creano fra i costituenti del luppolo in esame e le fasi (stazionaria e mobile) collocate nella colonna cromatografica, sfruttando l'equilibrio di affinità. HPLC è strutturata in una pompa per l'invio dell'eluente nella colonna ad una pressione tale da creare il flusso continuo, regolatore di pressione, colonna di ripartizione liquido-liquido

(fase stazionaria e fase mobile) rilevatore ed integratore ovvero un computer per il sistema di acquisizione delle immagini. Grazie alla forza applicata dalla pompa in testa alla colonna (circa 550Bar), l'eluente (la fase mobile) può scorrere dentro la fase stazionaria. Nella fase mobile si hanno 810ml di metanolo, 9ml di acido ortofosforico, 181 Milli-Q (acqua purificata e deionizzata). La fase eluente trasporta gli analiti nella colonna di analisi impaccata con l'opportuna fase stazionaria. L'equilibri di affinità tra le due fasi è espresso con il piatto teorico di una colonna cromatografica. Il piatto teorico corrisponde al tratto di colonna nel quale la specie chimica in analisi, stabilisce dei legami o interazioni con la fase più affine. Il tempo di fuori uscita dei componenti dalla colonna, dipende dalla polarità; una molecola polare formerà dei legami polari con la fase mobile ed impiegherà un tempo minore

a percorrere la colonna cromatografica ottenendo un tempo di ritenzione minore rispetto ai componenti non polari che rimarranno all'interno per un tempo maggiore. I soluti in uscita fluiscono attraverso un rilevatore che dà luogo ad un segnale proporzionale alla loro concentrazione. Il grafico riporta un cromatogramma: insieme di picchi che rappresentano l'eluzione dei singoli analiti, ovvero tempi di ritenzione, misurati dallo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 314nm. Nell'ordinata troviamo la misura della lunghezza d'onda in nanometri, nell'ascissa il tempo di ritenzione in minuti. Il tempo di ritenzione è l'espressione del ritardo con cui il soluto esce rispetto alla fase mobile. Le concentrazioni dei singoli componenti sono stimati dalla misurazione delle aree dei picchi e riferendosi ad un fattore di calibrazione. Un estratto standard di luppolo è adoperato come standard esterno di calibrazione di cui sono note le aree dei picchi ed i tempi di ritenzione.

- Calcolo concentrazione di ogni componente nel campione:

$$C_i = \frac{DF \cdot M_{cs} \cdot C_{ic} \cdot A_i}{M_s \cdot A_{ic}}$$

C_i = concentrazione del componente nel campione in esame, espressa in percentuale peso/peso

DF = fattore di diluizione.

M_{cs} = peso della soluzione di calibrazione in g

C_{is} = concentrazione dei componenti nella soluzione di calibrazione espressa come percentuale in g

A_i = area del picco del campione (media)

M_s = peso del campione in g

A_{ic} = area del picco del componente della soluzione di calibrazione (media)

- Contenuto totale α -Acidi espresso (in percentuale) come somma dei componenti coumulone C_{coh} e n+admulone C_{n+adh} .

$$C_{\alpha} = C_{coh} + C_{n+adh}$$

- Contenuto totale β -Acidi espresso (in percentuale) come somma dei componenti colupulone C_{col} e n+adlupulone C_{n+adl} .

$$C_{\beta} = C_{col} + C_{n+adl}$$

4.1.2- Essiccatore rotante e titolatore conduttimetrico automatico



Figura 2-3 *Essiccatore rotante.*

pallone si trova una vasca con acqua che al momento dell'attivazione dello strumento, inizierà a riscaldarsi raggiungendo 70°C (temperatura massima); nello stesso momento l'imboccatura alla quale è attaccato il pallone di vetro, inizierà a ruotare ad una velocità di circa 60rpm. L'essiccatore rotante consiste nel portare a riscaldamento la soluzione da estrarre in modo da favorire l'eliminazione dei solventi aggiunti al fine di ottenere degli estratti secchi.

Per la determinazione del Valore di Conduttanza, la frazione di resina totali, soft resine e hard resine del luppolo è stato adoperato il metodo Wöllmer (EBC method 7.1. EBC method 7.6 Gazlin,G., Brauwissenschaft, (1975), 28, 205 e 344.) può essere adoperato a tutte le parti del luppolo, sia prodotti in polvere, estratti e pellets. Il Wöllmer è un metodo che si avvale soprattutto dell'utilizzo dell'essiccatore rotante e titolatore conduttimetrico automatico. L'essiccatore rotante è composto da un aspiratore d'aria di pressione variabile collegato alla camera refrigerante nella quale scorre l'acqua fredda, collegata a sua volta ad un'imboccatura nella quale inseriamo il pallone di vetro. Sottostante al

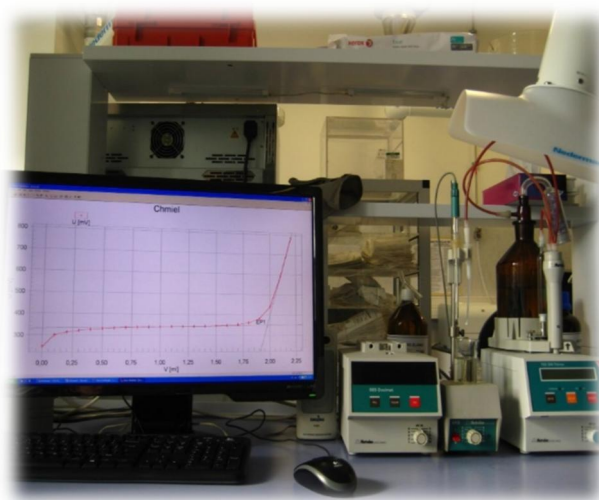


Figura 3-3 *Automatic conductometric titrator electrode*

Il titolatore conduttometrico automatico è composto da una soluzione di acetato di piombo ed un agitatore magnetico. SISTEMA fare in modo che le bolle d'aria non circolino tra gli elettrodi. Procedere con la titolazione conduttimetrica. Sarà registrata la conducibilità e tracciato un grafico che riporta il valore di conducibilità o punto finale (determinato dall'intersezione di due rette) corrispondente al volume di soluzione di acetato di piombo usato. La

soluzione di acetato di piombo viene preparata sciogliendo 20g di acetato di piombo $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ in 1000ml di metanolo contenenti 0,5ml di acido acetico glaciale. Standardizzare la soluzione di acetato di piombo prima di ogni serie di misurazioni. Il valore di conduttanza al piombo delle sostanze amare estratte, è determinato dalla titolazione conduttimetrica della fase eterea utilizzando la capacità degli acidi di formare dei sali di piombo.

4.1.3- GC-MS (Gas Cromatografia e Spettrometria di Massa)



Figura 4-3 Gascromatografo Varia CP-3800

La gas-cromatografia (GC) è una tecnica di separazione qualitativa e quantitativa in base alle caratteristiche di polarità dei vari costituenti di miscele complesse. Accoppiato con lo spettrometro di massa (MS) che permette l'identificazione delle molecole in base al peso molecolare caratteristico. Le analisi di GC-MS sono state condotte con un gascromatografo Varian CP-3800

con colonna capillare di separazione in silice fusa di polimide di tipo DB5 lunga 30 m x 0,25 mm di diametro. La fase stazionaria è costituita da 5% bifenile e 95% dimetilpolisilossano con uno spessore di 0,25 μm ed una fase mobile rappresentata dal gas Elio inerte di trasporto. (Morelli, 2005) Il campione prelevato 0,5 μl è stato inserito attraverso un iniettore in cui il campione passa in fase gassosa grazie alla temperatura a cui opera la colonna contenuta in un forno termostato all'interno della quale la temperatura aumenta in modo programmato (partendo da 60°C per poi aumentare di 3°C al minuto fino a raggiungere 220/240°C. Il gas cromatografo è accoppiato ad un detector di massa Varian Saturn 2000 ed un sistema che traduce i segnali in cromatogramma. Le molecole sono colpite da un fascio di elettroni ad elevata energia che ne provoca la dissociazione in frammenti di peso caratteristico che fornisce un segnale o picco. Il riconoscimento dei composti è stato riscontrato basandosi sul confronto dei loro tempi di ritenzione, indici di Kovats e spettri di massa con quelli già noti (sostanze pure) nelle librerie commerciali NIST 98 ed ADAMS 95.

Calcolo degli Indici di Kovats KI

Indici di Ritenzione Lineare (LRI) riportati in letteratura servono per riconoscere il tempo di ritenzione di un campione incognito relativamente a quelli già noti e studiati. Il calcolo si basa sull'utilizzo di una miscela di idrocarburi (C10-C28) iniettata precedentemente alle iniezioni analitiche degli olii e delle frazioni volatili. Il tempo di ritenzione di un composto incognito viene riportato relativamente a quello di tali idrocarburi presenti nella miscela, utilizzando una scala logaritmica. Per definizione ad ogni idrocarburo è assegnato un indice pari a 100 volte il numero dei suoi atomi di carbonio. Solitamente l'indice di Kovats si indica con **I**

$$I = 100 \left[n + (N - n) \frac{\log t'(x) - \log t'(n)}{\log t'(N) - \log t'(n)} \right]$$

n = numero di carboni nell'alcano inferiore

N = numero di carboni nell'alcano superiore

t_x = tempo di ritenzione del picco incognito, in minuti

4.1.4- Head-Space Solid Phase Micro-Extraction (HS-SPME)



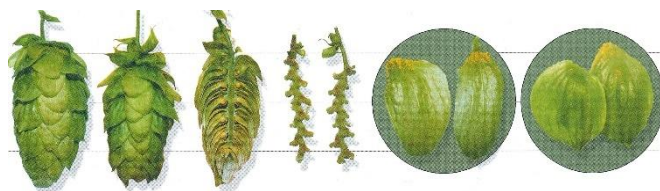
Figura 5-3 *Contatto tra fibra adsorbente e spazio di testa.*

La Micro-Estrazione in Fase Solida è una tecnica preparativa semplice, poco costosa e dotata di elevata sensibilità che non richiede l'utilizzo di solventi. La tecnica permette di rilevare i composti volatili emessi spontaneamente da una pianta. Il campione da analizzare, viene inserito in un contenitore e lasciato ben chiuso, per un tempo variabile, in base alla capacità di rilascio di composti organici volatili caratteristici di ogni singola pianta. Si instaurerà così un equilibrio tra i composti volatili (VOC) emessi e la fase aeriforme presente all'interno del contenitore, detta spazio di testa (HS- headspace). Campioni più odorosi tenderanno a rilasciare maggiori quantità di VOC, quindi necessiteranno di tempi più brevi rispetto a campioni con emissioni ridotte. La quantità di composto organico volatile adsorbito dalla fibra, è direttamente proporzionale alla sua concentrazione nel campione. L'analisi consiste nell'utilizzo di una siringa contenente un ago cavo munito di una fase solida, una volta inserito all'interno dello spazio di testa, viene estrusa la fibra (1 cm x 1000 µm) rivestita di materia estrattiva apolare solida di polidimetilsilossano (PDMS), avente un diametro di 100 µm. Ricordiamo che la fibra non deve entrare mai in contatto con il campione in sé ma rimanere nello spazio di testa. L'ago ricopre la funzione di protezione della fibra durante le operazioni di foratura del rivestimento del campione e l'iniezione nel gas-cromatografo. La fibra estraente è montata su di un opportuno dispositivo meccanico, cilindro in acciaio inox con pistone in materiale polimerico e regolatore di profondità. Al termine del procedimento, la fibra verrà trasferita nell'iniettore de gas-cromatografo associato allo spettrometro di massa dove avverrà il deadsorbimento termico (150-200°C) dell'analita e la separazione e l'identificazione quali-quantitativa dei vari costituenti.

4.2-Parte Sperimentale

La mia prima fase di ricerca si è svolta in Polonia, nella regione Lubelskie precisamente nel paese di Pulawy. Ho usufruito dell'opportunità Erasmus Traineeship per tre mesi, proposto dall'Università di Pisa. In questo periodo ho intrapreso la mia prima fase di studio di ricerca presso l'istituto IUNG (Institute Science and Cultivation Plant) dove sono stati analizzati i coni di cinque diverse cultivar di luppolo della stagione 2014-2015 coltivati nella regione Lubelskie. Di ciascuna cultivar di luppolo ho analizzato sia la coltivazione sana che infetta. Il primo step ho lavorato con HPLC per quantificare la concentrazione di alfa e beta acidi. In un secondo momento ho applicato il metodo Wöllmer utilizzato per quantificare il valore di conduttanza, resine totali, soft resine e hard resine. Al rientro in Italia, presso il Dipartimento di Fitochimica dell'Università di Pisa, mi sono occupata dalla frazione volatile delle cinque cultivar già precedentemente analizzate nell'istituto IUNG. Nel laboratorio di fitochimica ho estratto gli olii essenziali per ciascuna cultivar (sia sana che infetta) con l'idrodissillatore in corrente di vapore e analizzati con GC-MS. Nell'ultima fase del lavoro, ho analizzato la componente volatile usufruendo dello strumento SPME.

4.2.1- Campioni di cultivar di luppolo analizzate



- **Lubelski:** la pianta con forma claviforme, presenta una crescita vigorosa. Il gambo è di colore rosso-verde, la densità delle foglie è media. I coni sono numerosi in particolare nella parte superiore della pianta, di color giallo-verde e di media lunghezza (circa 3cm), allungati, leggermente oblati; le brattee sono leggermente deviate dal cono e ampiamente distanziate. L'aroma è genuino, delicato e molto piacevole.

La raccolta avviene alla fine di agosto. La stabilità degli acidi amari durante lo stoccaggio è buona.



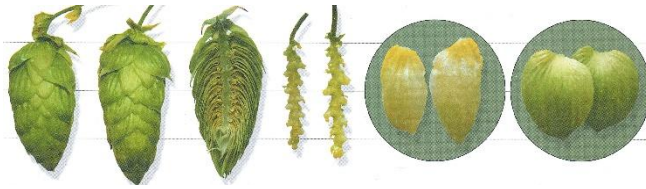
- **Magnat:** la pianta ha una crescita vigorosa. I coni sono di forma cilindrica e regolari fra loro, molto numerosi, uniformemente distribuiti e di colore verde-rosso. La densità delle foglie è media. L'aroma è piacevole, armonico ed intenso. Il tempo della raccolta avviene nella seconda metà di settembre.



- **Pulawski:** presenta un portameto vigoroso, di forma cilindrica regolare. La densità delle foglie è media. I germogli laterali sono lunghi. I coni sono numerosi, uniformemente distribuiti sulla pianta. La cultivar è caratterizzata da una buona produttività. I coni sono di medie dimensioni, di forma ovale un po' smussati all'apice e di colore verde. Le brattee sono leggermente devianti dal cono. L'aroma è piacevole, armonico e delicato. Tempo di raccolta avviene nella prima metà di settembre.



- **Sybilla:** selezione di ibrido della progenie di Lubelski con un maschio selvatico proveniente dalla ex paese Jugoslavia. Primo anno di coltivazione 1996; tra il 2004-2006 sono state prodotte piante libere dal virus e viroide latente del luppolo. La crescita della pianta è molto veloce ed energica, ha una forma cilindrica, gambo verde-rossastro con strisce distinte. La quantità delle foglie è media, i germogli laterali sono lunghi ed affatto fragili. I coni sono veramente numerosi ed uniformemente distribuiti sulla pianta, sono di color verde chiaro, larghi (lunghi circa 4cm), allungati ed un po' appuntiti all'apice. Le brattee sono chiuse e molto dense. L'aroma è piacevole, armonico e delicato. Il periodo di raccolta si effettua nella prima metà di settembre.



- **Marynka:** è stato selezionato dall'ibrido della progenie di Brewers Gold con un maschio selvatico

proveniente dall'ex Jugoslavia. Anno d'inizio di coltivazione 1988. La pianta presenta un portamento delicato ed una crescita lenta. Il gambo è di color verde. La densità delle foglie è bassa, la maggior parte delle quali ha cinque lobi. I coni sono abbastanza numerosi uniformemente distribuiti sulla pianta, di color verde chiaro e media grandezza (circa 3cm), a forma di uovo un po' appuntito nella parte apicale; le brattee sono chiuse e molto dense. L'aroma è piacevole, leggermente fruttato ed intenso. La raccolta viene effettuata nella prima metà di settembre. (Monika Agacka, Dr. Urszula Skomra, Dr. Mieczyslaw Stasiak. Polish hop cultivars. 2010).

4.2.2- HPLC

Il campione da analizzare proveniva dal magazzino in cui era conservato al riparo dalla luce, dall'umidità e dalle alte temperature. Per ciascun campione, è stata macinata finemente una quantità sufficiente di circa 40g. In seguito alla polverizzazione è stato necessario mescolare accuratamente il prodotto in quanto il luppolino tende a depositarsi sul fondo. Sono stati pesati esattamente 10g di ciascun campione ed inseriti nelle apposite bottiglie tarate di vetro, (250ml di capienza). Le weighing bottle, precedentemente pesate prive di campione, dovranno essere pesate anche in seguito all'aggiunta di una massa di circa 3-4g di materiale ed inserire nell'essiccatore per 1.30h alla temperatura di 105°. Al termine dell'essiccazione, le weighing bottle saranno nuovamente pesate per calcolarne la percentuale di acqua evaporata durante il processo di essiccazione.

La sostanza secca DW (dry weight) è calcolata:

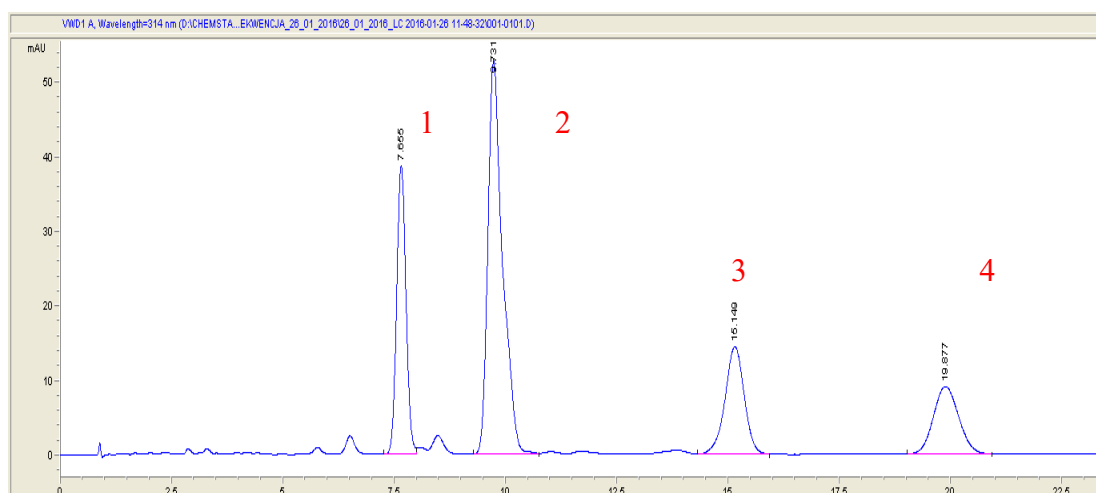
$$DW = \frac{\text{peso dopo } 105^{\circ} - \text{peso solo della bottiglia}}{\text{peso della bottiglia con il campione} - \text{peso solo della bottiglia}} \cdot 100$$

DW esprime il contenuto di sostanza secca in percentuale (peso/peso).

Per la preparazione della soluzione di estrazione sono stati addizionati 20ml di metanolo puro, 100ml di dietiletere massimo allo 0,2% di acqua, 40ml di soluzione di acido cloridrico 0,1mol/L. I palloni sono stati posti sullo shaker automatico a 220/230 rpm per 40 minuti. Dopo un'attesa di 10minuti si osserva la separazione delle fasi e la formazione del corpo di fondo. Vengono prelevati 5ml di surnatante con la pipetta nel pallone tarato da 50ml e portati a volume con metanolo puro poi miscelati accuratamente. Vengono prelevati circa 2ml, avvalendosi di una siringa con filtro di membrana 0,45 micrometri ed inseriti nelle vials (fiale per HPLC). L' HPLC viene attivato impostando un flusso eluente di 1ml/min, controllando l'intero sistema, impostando il rilevatore ad UV a 314nm e riscaldando la colonna a circa 40-45 °C. Prima e dopo la serie di campioni è necessario equilibrare la colonna con una soluzione di calibrazione. Estratto di calibrazione Internazionale (ICE) ha un contenuto noto di α -acidi e β -acidi, viene usato come standard esterno per la taratura dell'apparecchiatura.

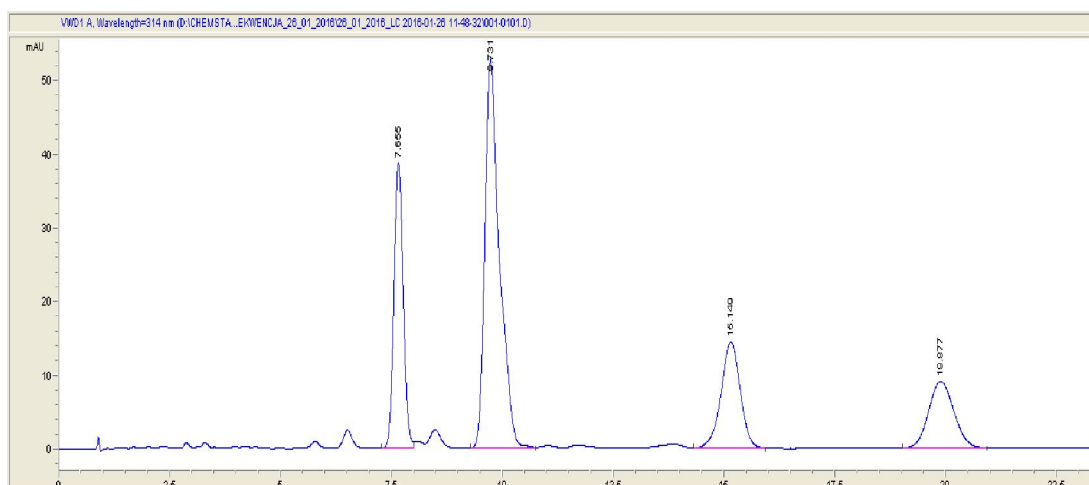
Cromatogramma della soluzione standard di luppolo.

- 1- Picco Area Coumulone
- 2- Picco Area Adumulone + Umulone
- 3- Picco Area Colupulone
- 4- Picco Area Adlupulone + Lupulone



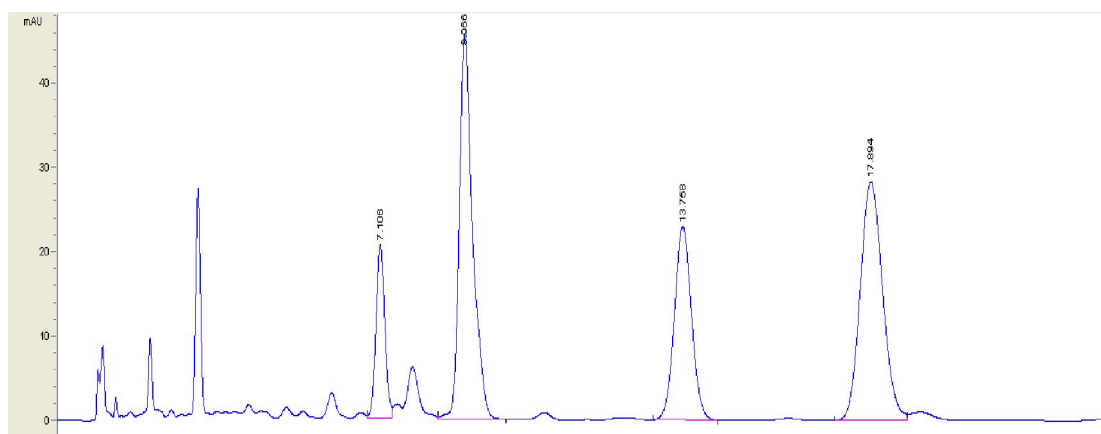
Cromatogrammi relativi ai campioni di luppolo analizzate

Cromatogramma della soluzione di calibrazione utilizza il 26/01/2016



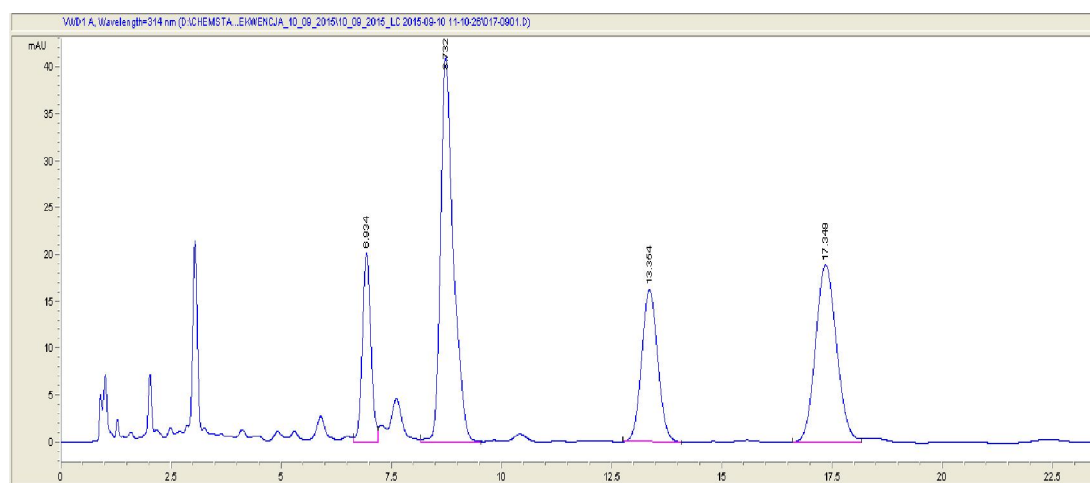
#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	7.655	563	38.7	0.2265	0.911
2	9.731	1213.2	52.8	0.335	0.595
3	15.149	431.6	14.4	0.4553	1.04
4	19.877	357.1	9.1	0.6065	0.884

Cromatogramma Lubelski Sano.



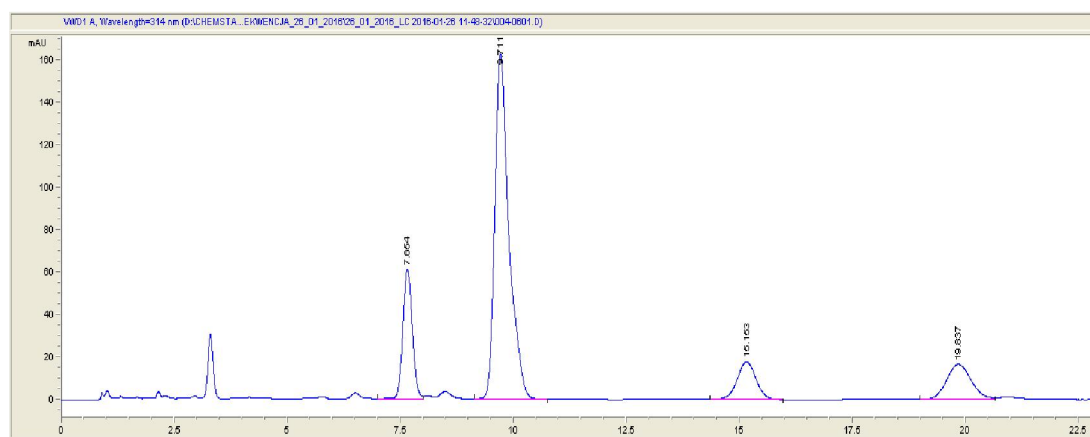
#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	7.106	281.6	20.6	0.2116	0.919
2	8.966	934.3	45.8	0.3007	0.676
3	13.758	602.5	22.9	0.4055	0.928
4	17.894	967.5	28.3	0.5318	0.862

Cromatogramma Lubelski Infetto.



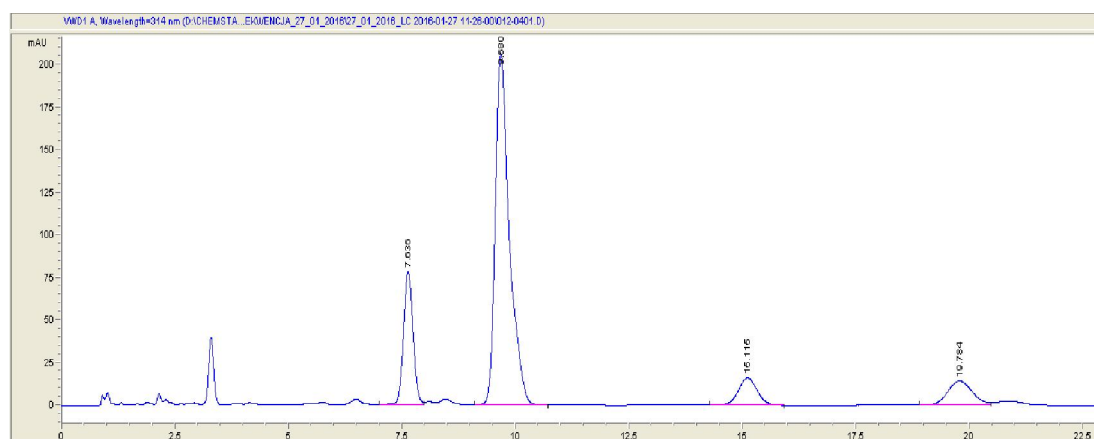
#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	6.934	274.5	20.2	0.211	0.92
2	8.732	834.8	41	0.2985	0.649
3	13.354	414.2	16.3	0.3947	0.928
4	17.349	628.2	18.9	0.5145	0.879

Cromatogramma Magnat Infetto.



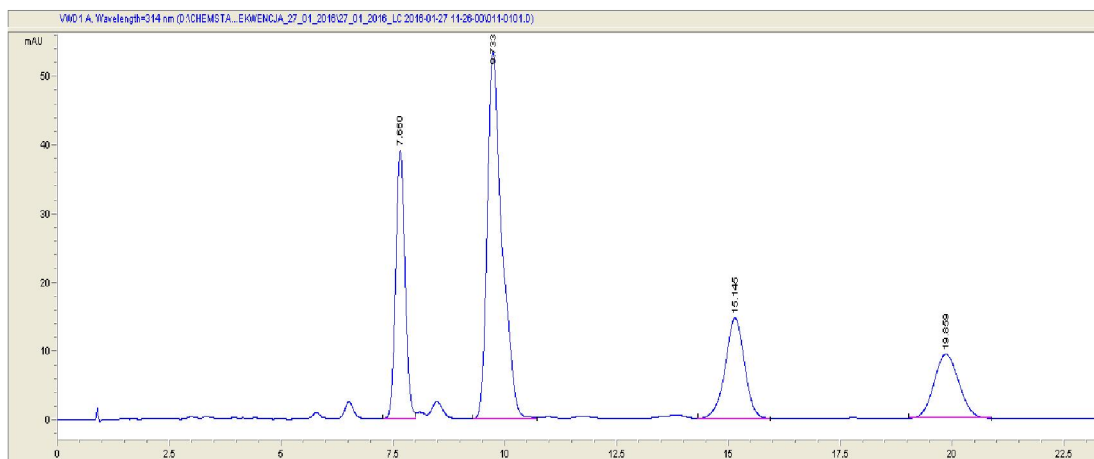
#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	7.654	909	61.3	0.2298	0.93
2	9.711	3528.8	162.8	0.3198	0.627
3	15.153	521.1	17.9	0.4481	0.977
4	19.837	628.8	16.6	0.5897	0.867

Cromatogramma Magnat Sano.



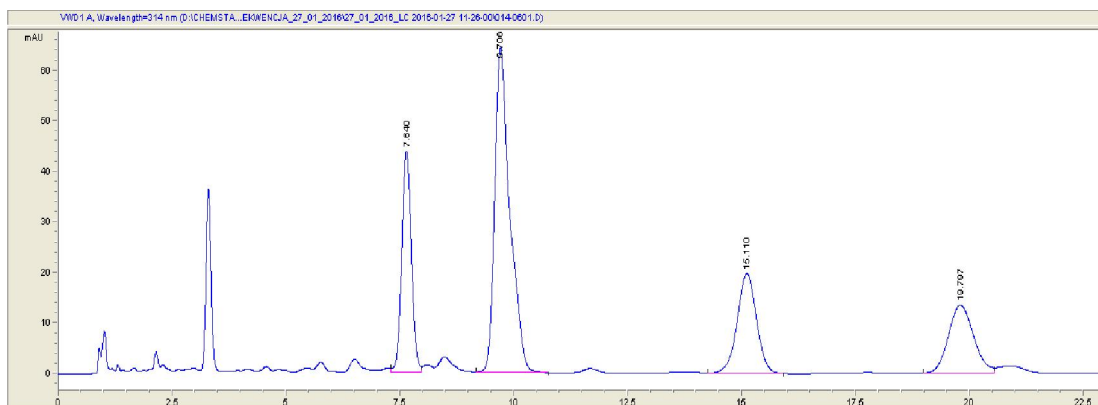
#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	7.636	1156.3	78.3	0.2292	0.931
2	9.68	4446.8	206.4	0.3183	0.617
3	15.115	462.8	16	0.4458	0.951
4	19.784	539.9	14.2	0.592	0.867

Cromatogramma Pulawski Sano.



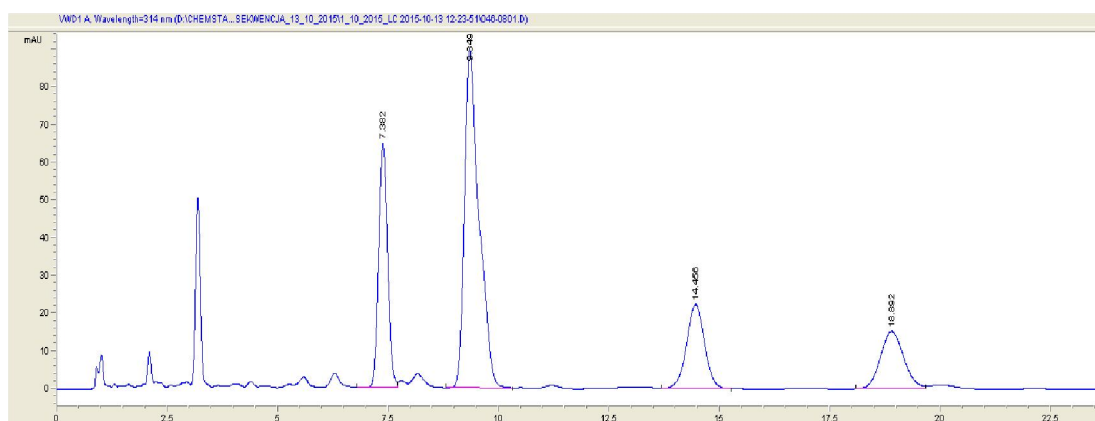
#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	7.66	568.4	39.1	0.2266	0.91
2	9.733	1224.9	53.3	0.335	0.594
3	15.145	438.1	14.6	0.4567	1.041
4	19.859	361.3	9.3	0.5989	0.902

Cromatogramma soluzione di Calibrazione 27/01/2016



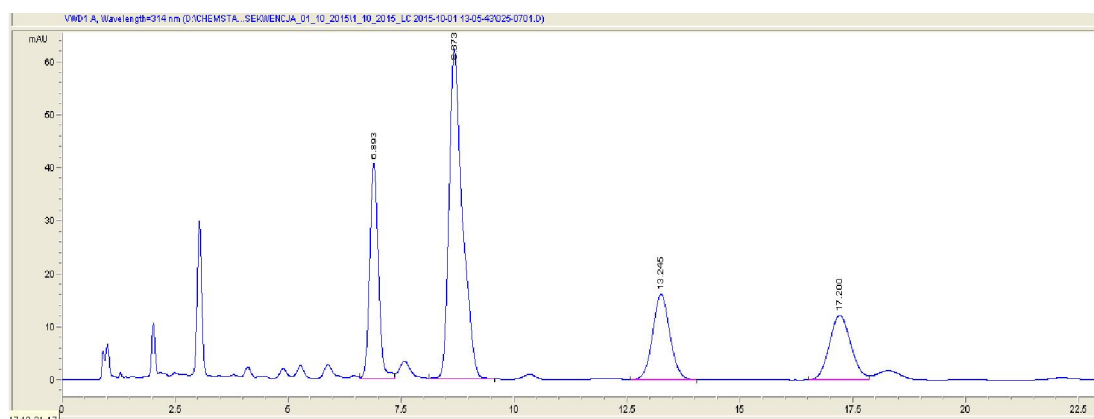
#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	7.64	648.8	43.9	0.2292	19.990	0.93
2	9.706	1492.8	64.4	0.3362	45.997	0.593
3	15.11	585.4	19.8	0.4572	18.037	0.994
4	19.797	518.5	13.5	0.5994	15.976	0.867

Cromatogramma Pulawski Infetto.



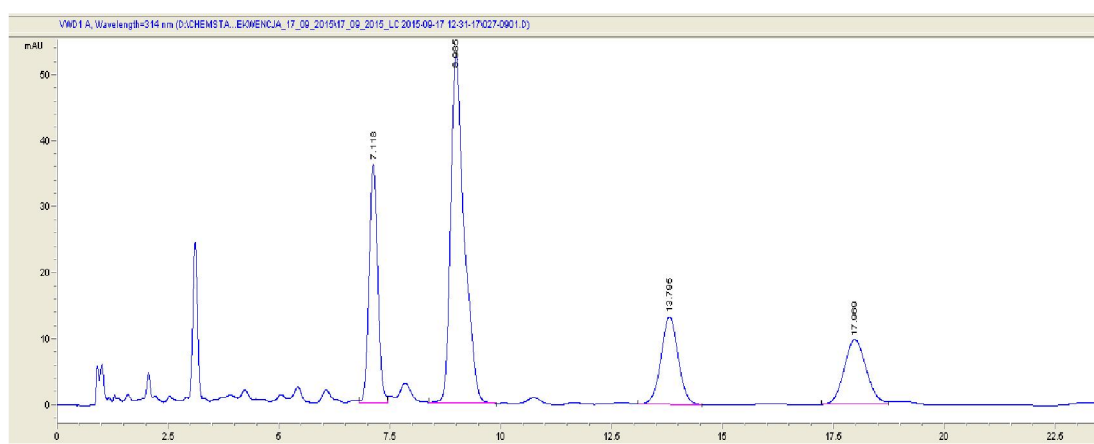
#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	7.382	912.1	64.8	0.2181	0.905
2	9.349	2058.1	89.5	0.3309	0.555
3	14.456	627.1	22.3	0.4349	0.979
4	18.892	555.9	15.2	0.5648	0.877

Cromatogramma Sybilla Sano.



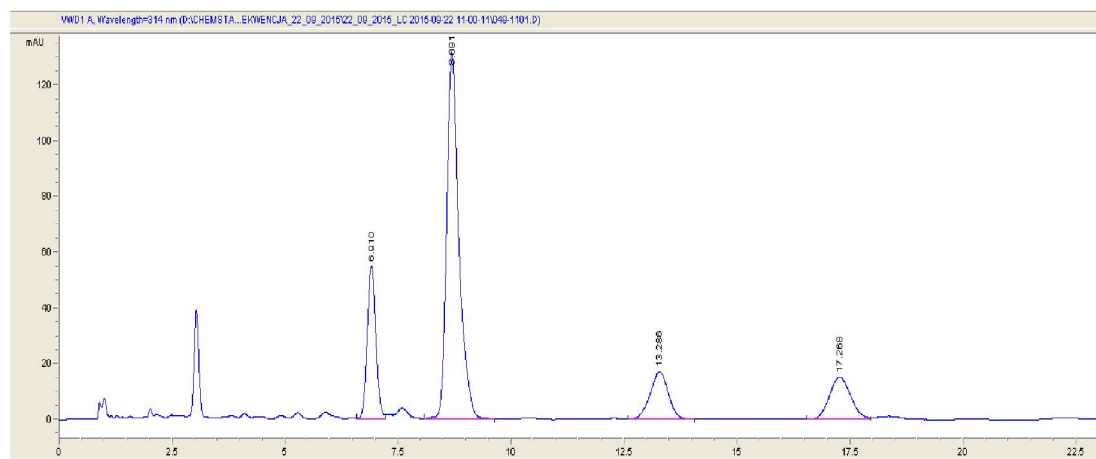
#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	6.893	548	40.7	0.2081	0.866
2	8.673	1283.3	62.2	0.3003	0.608
3	13.245	431.2	16.2	0.4085	0.909
4	17.2	406.8	12.2	0.5134	0.888

Cromatogramma Sibylla Infetto.



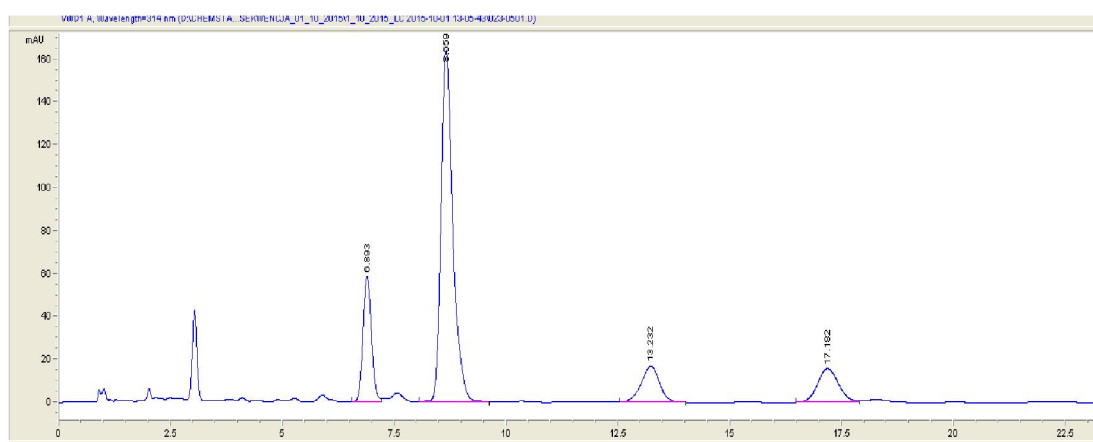
#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	7.118	493.7	36.2	0.2114	0.912
2	8.985	1117.6	52.5	0.3096	0.617
3	13.795	359.7	13.3	0.4172	0.958
4	17.969	345.4	9.9	0.5385	0.877

Cromatogramma Marynka Infetto.



#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	6.91	732.8	55	0.2064	0.903
2	8.691	2469.7	131.3	0.2821	0.696
3	13.286	484.2	17.1	0.4333	1.062
4	17.268	504.3	15.2	0.5147	0.883

Cromatogramma Marynka Sano.



#	Time	Area	Height	Width	Symmetry
1	6.893	770.9	58.4	0.2049	0.901
2	8.659	2979.3	163.7	0.2735	0.71
3	13.232	481.8	16.9	0.4304	1.087
4	17.182	516.2	15.8	0.5056	0.876

4.2.3- Metodo Wöllmer

Il metodo Wöllmer ha lo scopo di determinare le sostanze amare nel luppolo: valore di conduttanza al piombo, resine totali, soft resins e hard resins. La prima fase consiste nel pesare accuratamente 10g di luppolo finemente macinato (bilancia analitica esatta 0,05g) e trasferirlo in pallone di vetro tarato da 250ml di capienza. Aggiungere 20ml di metanolo puro, 100ml di dietiletere allo 0,2% di acqua e 40ml di 0,1mol/L di soluzione di acido cloridrico. Tappare i palloni e porli sullo shaker per un tempo di 40 minuti ad una velocità ottimale. Le sostanze amare sono disciolte in questa fase. A termine occorre attendere 10 minuti per permettere la separazione delle fasi. Prelevati 50ml di surnatante, sono stati aggiunti 25ml di diclorometano e riversati in palloni. Ciascun pallone di vetro viene posto singolarmente nell'evaporatore rotante alla temperatura di 70°C per rimuovere il solvente. Avviare la pompa dell'acqua collegato a sua volta alla camera refrigerante del Wollmer, chiudere il rubinetto di vetro di entrata dell'aria in modo che un flusso costante di aria venga aspirata attraverso la muffola per evitare qualsiasi ritardo di ebollizione. Dopo l'evaporazione dei solventi, ottenuto l'estratto secco, pulire completamente il pallone di vetro con una soluzione metanolica e trasferirla attraverso un imbuto in un pallone tarato da 50ml portandola a volume. Chiudere il matraccio e riporlo per un'ora in frigorifero a 0°C per far precipitare le cere del luppolo (ricche di alcoli, esteri, idrocarburi, ecc..). Successivamente, filtrare la soluzione posizionando un filtro di carta adsorbente nel collo di un altro matraccio tarato da 50ml.

- **Determinazione Resina Totale:** prelevare 10ml di soluzione con la pipetta in un pallone tarato da 100ml ben pulito e conservato per alcune ore in un essiccatore (precedentemente pesato). Rimuovere il metanolo per distillazione usando l'evaporatore rotante a 70°C a leggera depressione. Togliere il matraccio dall'evaporatore e collegarlo ad un adattatore sotto vuoto (pressione inferiore a 20 mbar) per almeno 6 minuti, al fine di essiccare completamente il residuo. Asciugare accuratamente il pallone e mantenerlo per almeno 30 minuti in un essiccatore. Infine pesare sulla bilancia analitica.

Calcolo della Resina Totale:

$$\text{Resina Totale \% (g/g)} = \frac{[\text{PESO DEL RESIDUO (g)} - \text{PESO SENZA RESIDUO(g)}] \cdot 1000}{N}$$

N = massa del campione iniziale.

- **Determinazione Resina Soft:** prelevare 10ml di soluzione con la pipetta in un cilindro graduato da 100ml. Aggiungere 5ml di metanolo e 40ml di n-esano. Tappare il cilindro ed agitare brevemente. Aggiungere anche 10ml di soluzione di acido cloridrico 0,1 mol/litro. Porre nuovamente il tappo al cilindro ed agitare per 5 minuti con shake automatico o in alternativa agitare vigorosamente per circa 30 secondi con le mani. Attendere almeno 30 minuti per la separazione delle fasi. Asportare 30ml di surnatante e versare in un pallone di vetro tarato, accuratamente pulito e ben asciutto conservato per almeno 30 minuti in un essiccatore. Utilizzare l'evaporatore rotante a 70°C, in leggera depressione, per distillare n-esano. In un secondo momento, rimuovere collegare il pallone ad un adattatore di vuoto; essiccare il residuo sotto vuoto ad una pressione inferiore a 20mbar per almeno 6 minuti. Conservare il matraccio in un essiccatore per almeno 30 minuti, poi pesare con la bilancia analitica.

Calcolo Soft Resina:

$$\text{Soft Resina \% (g/g)} = \frac{[\text{PESO DELLA RESINA (g)} - \text{PESO SENZA RESINA(g)}] \cdot 1333}{N}$$

N= massa del campione iniziale.

Calcolo Hard Resina:

$$\text{Hard Resina \% (g/g)} = \text{Resina Totale} - \text{Soft Resin}$$

- Determinazione Alfa-Acidi:** prelevare 10ml di soluzione con la pipetta in un becher di vetro da 100ml ed aggiungere 40ml di miscela etanolo/DMSO. Disporre il becher nel titolatore conduttimetrico automatico. Assicurarsi che gli elettrodi siano completamente immersi posizionando la micro-buretta, contenente la soluzione di acetato di piombo, in modo tale che la punta sia immersa almeno 3 o 4 cm nella soluzione in analisi. Mescolare la soluzione con un agitatore magnetico, fare in modo che le bolle d'aria non circolino tra gli elettrodi. Procedere con la titolazione conduttimetrica. Sarà registrata la conducibilità e tracciato un grafico che riporta il valore di conducibilità o punto finale (determinato dall'intersezione di due rette) corrispondente al volume di soluzione di acetato di piombo usato. La soluzione di acetato di piombo viene preparata sciogliendo 20g di acetato di piombo $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ in 1000ml di metanolo contenenti 0,5ml di acido acetico glaciale. Standardizzare la soluzione di acetato di piombo prima di ogni serie di misurazioni. Il valore di conduttanza al piombo delle sostanze amare estratte, è determinato dalla titolazione conduttimetrica della fase eterea utilizzando la capacità degli acidi di formare dei sali di piombo.

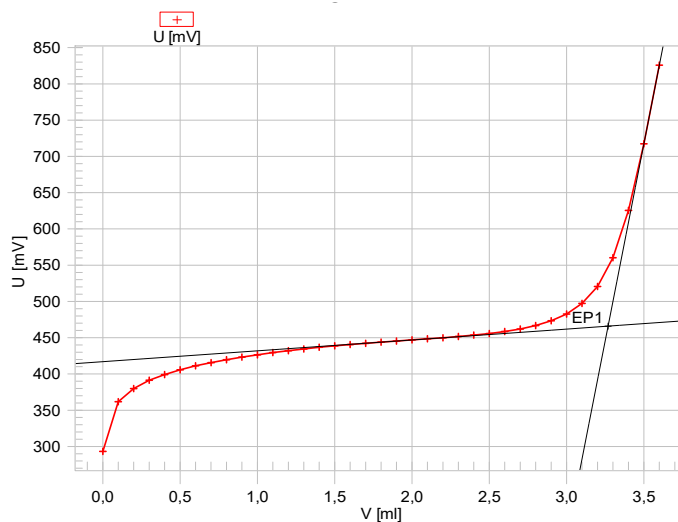


Figura 4-3 Grafico del valore di conduttanza al piombo dei coni di luppolo.

Calcolo del Valore di Conduttanza al Piombo:

$$\text{LCV \% (g/g)} = \frac{358 \cdot \left(\frac{100}{10}\right) \cdot \text{end.p} \cdot C}{379,4 \cdot W}$$

$$= \frac{9,44 \cdot \text{end.p} \cdot C}{W}$$

end.p = punto di fine della titolazione, volume di soluzione di acetato di

piombo usato in ml.

358 = peso molecolare medio degli α -acidi

C = concentrazione della soluzione di acetato di piombo in % (g/100ml)

379,4 = peso molecolare dell'acetato di piombo triidrato reattivo

W = peso iniziale dell'esempio (g)

$$9,44 = 358 \cdot 10 / 379,4$$

Calcolo Frazione β -Acidi:

Frazione β -Acidi % (g/g) = Soft Resina – Valore α -Acidi

4.2.4- Profilo aromatico del luppolo

Le piante possiedono tessuti specializzati nella secrezione di resine, gomme, mucillagini, latici ed olii essenziali (presenti in parti diverse come radici, rizomi, foglie e fiori). Quest'ultimi sono i secreti più diffusi ed abbondanti, sono miscele di molecole organiche volatili ovvero che evaporano facilmente anche a temperatura ambiente, aventi sapore ed odore caratteristico. Gli olii essenziali sono sostanze lipofile insolubili in acqua e solubili nei solventi organici. Possono subire trasformazioni chimiche a causa di vari fattori: il periodo di crescita, momento stagionale, influsso climatico e l'altitudine. Gli olii essenziali rivestono molteplici funzionalità: di riserva alimentare, di barriera di protezione come meccanismo di difesa, inibizione della crescita di altre specie, attrattori gli insetti favorendo così l'impollinazione. In base ai gruppi funzionali, i costituenti di un'essenza possono essere raggruppati in categorie principali:

- Idrocarburi non ramificati
- Derivati del benzene
- Terpeni aciclici e ciclici
- Composti ossigenati: aldeidi, chetoni, alcoli, esteri ed acidi.
- Composti solforati ed azotati

4.2.4.1- Idrodistillazione in corrente di vapore (Clevenger)

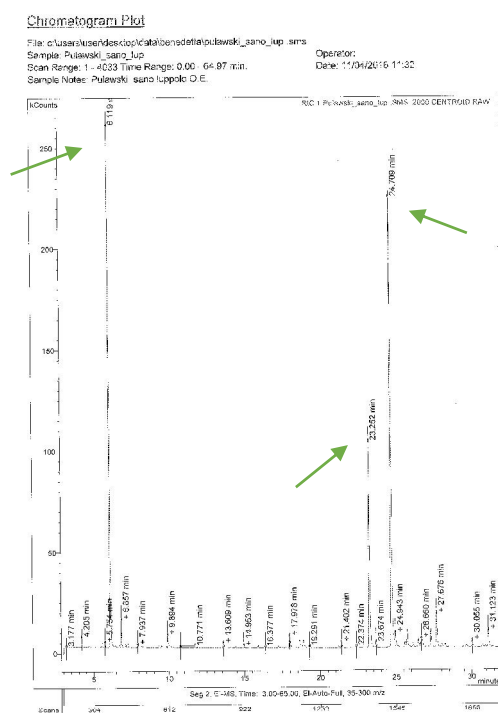
Il metodo di estrazione utilizzato in questa tesi è stata l'idrodistillazione in corrente di vapore applicabile con lo strumento Clevenger (secondo il metodo riportato nella F.U.I XII) ed è stata effettuata presso il laboratorio di Fitochimica del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Pisa. Per l'estrazione sono stati utilizzati circa 40g di coni di luppolo essiccati immersi in 1000g di acqua. L'idrodistillazione in corrente di vapore è una tecnica di estrazione a caldo a pressione atmosferica, dotato di un pallone di 2 litri di capacità avvolto da un termomanto. Il collo del pallone di vetro convenzionale è collegato ad un refrigerante ed una buretta graduata dove viene raccolto l'olio essenziale. (Ivano Morelli- Guido Flamini- Luisa Pistelli. Manuale dell'erborista. 2005). La resa dell'olio essenziale recuperato con questo metodo è riportato nella tabella successiva e l'olio è stato conservato in vials alla temperatura di 5° fino al momento dell'analisi quali-quantitativa. Al termine del processo, della durata di 2 ore, si diluisce l'olio essenziale del 10% con n-esano. La soluzione sarà iniettata direttamente in GC-MS.

MATERIALE	QUANTITÀ gr	RESA % O.E
Sybilla Sano	36	0,6
Sybilla Infetto	33	0,7
Lubelski Sano	27,5	0,2
Lubelski Infetto	28	0,5
Pulawski Sano	37	0,8
Pulawski Infetto	47	0,5
Magnat Sano	43,5	0,8
Magnat Infetto	42	0,6
Marynka Sano	30,5	1,1
Marynka Infetto	32,5	1,2

4.2.4.2- Gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS)

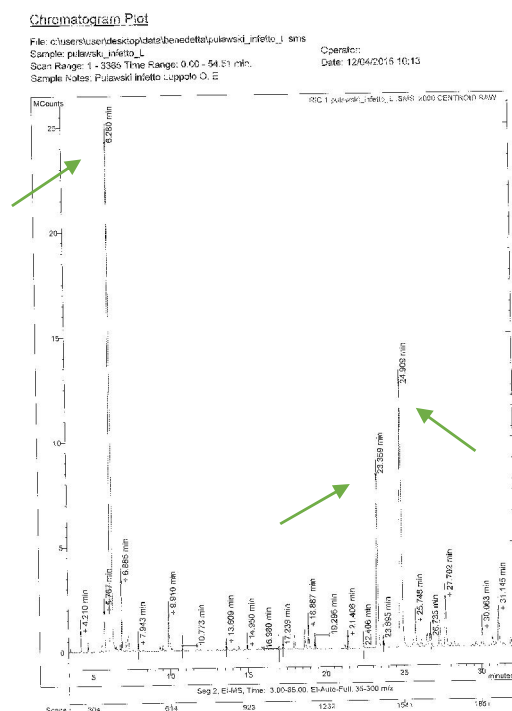
Le analisi GC/MS sono state condotte con gas cromatografo VARIAN CP-3800 provvisto di colonna capillare (30 m x 0,25 mm; spessore di rivestimento 0,25 μm) e un detector di massa VARIAN SATURN 2000. Le condizioni analitiche sono state le seguenti: temperatura dell'iniettore e della transfer line rispettivamente di 220 e 240°C; temperatura del forno programmata da 60 a 240°C con aumento progressivo di 3°C/min; iniezione di 0,2 μl ; rapporto di split 1:30. Per ciascuna cultivar di luppolo sono state preparate le vials da 2ml. Si immettono 0,2 ml di OE da analizzare e si portano a volume con 1,098 ml di n-esano (HPLC grade). La soluzione così ottenuta viene agitata per 10 sec con vortex, ed infine chiusa con tappo munito di setto forabile. L' identificazione dei costituenti si è basata sul confronto dei loro indici di Kovats con quelli di campioni autentici e sulla corrispondenza con gli spettri di massa presenti nelle librerie commerciali del computer (NIST e ADAMS) e in quella creata usando sostanze pure, costituenti di olii a composizione nota e dati di massa presenti in letteratura.

Esempio di un cromatogramma, di una cultivar di luppolo sano, ottenuto dall'analisi con GC-MS



Nel cromatogramma sono evidenziati i picchi dei principali campioni con i relativi tempi di ritenzione: 6,12 per il *myrcene*, 23,26 per il *β -caryophyllene* e 24,71 l' *α -humulene*.

Esempio di cromatogramma, di cultivar di luppolo infetto, ottenuto con l'analisi GC-MS

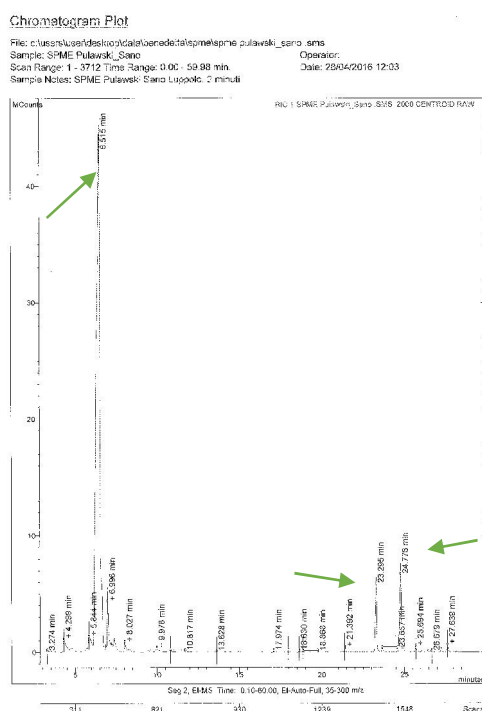


Nel cromatogramma sono evidenziati i picchi dei principali campioni con i relativi tempi di ritenzione: 6,28 per il *myrcene*, 23,36 per il β -*caryophyllene* e 24,91 per l' α -*humulene*.

4.2.3.2- SPME dei coni del luppolo

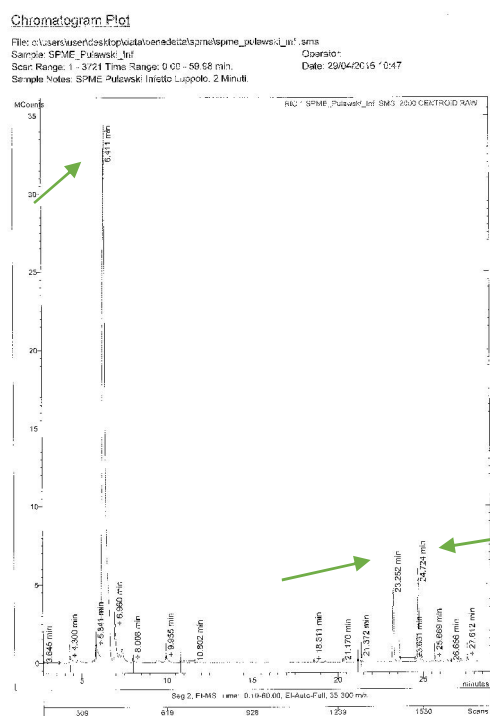
Per l'utilizzo di tale tecnica sono occorsi tre o quattro coni di luppolo per ciascuna cultivar. I coni sono stati leggermente frantumati una volta posti in barattoli di piccola capienza e chiusi successivamente con la carta stagnola in modo da creare un tappo per evitare dispersione nell'ambiente circostante. È necessario lasciare qualche minuto il materiale di analisi all'interno del contenitore ben chiuso in modo che i composti volatili saturino l'ambiente interno. Il tempo di esposizione della fibra è stato di 2 minuti per ciascuna cultivar, in quanto ogni coltivazione emanava un intenso odore.

Esempio di cromatogramma di cultivar di luppolo sano, analizzato con SPME



Nel cromatogramma sono evidenziati i picchi dei principali campioni con i relativi tempi di ritenzione: 6,52 nel *myrcene*, 23,29 nel *β -caryophyllene* e 24,77 l' *α -humulene*.

Esempio di cromatogramma di cultivar di luppolo sano, analizzato con SPME



Nel cromatogramma sono evidenziati i picchi dei principali campioni con i relativi tempi di ritenzione: 6,41 per il *myrcene*, 23,25 per il *β-caryophyllene* e 24,72 l'*α-humulene*.

5- Risultati e discussione

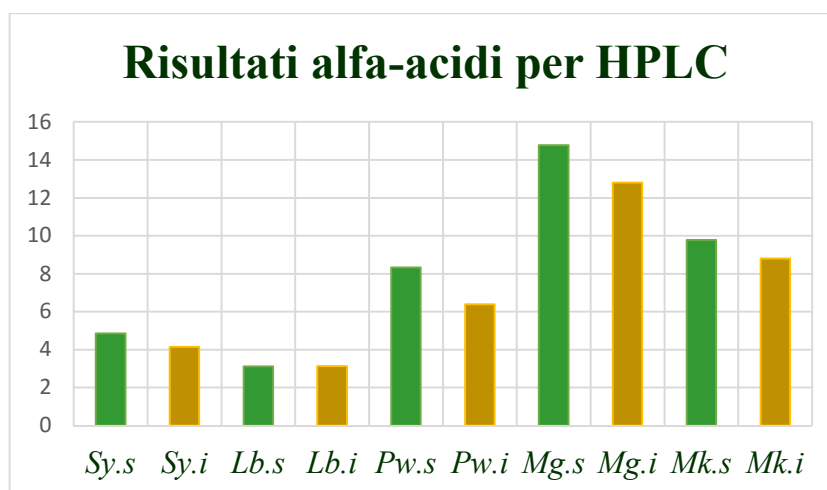
5.1 Valutazione degli alfa-acidi e beta-acidi per HPLC

Tabella 1: risultati ottenuti

Cultivar		Cumulone	N+Admulone	Alfa Acidi	Colupulone	N+Adlupulone	Beta Acidi
Sybilla	sano	1,4	3,46	4,86	1,4	1,29	2,69
	infetto	1,22	2,92	4,14	1,14	1,06	2,19
Lubelski	sano	0,69	2,42	3,11	1,88	2,94	4,82
	infetto	0,74	2,39	3,13	1,43	2,11	3,54
Pulawski	sano	2,48	5,85	8,33	2,14	1,85	3,98
	infetto	1,78	4,61	6,39	2,01	1,76	3,77
Magnat	sano	2,93	11,84	14,78	1,56	1,72	3,28
	infetto	2,38	9,7	12,8	1,77	2,07	3,84
Marynka	sano	1,93	7,85	9,78	1,53	1,6	3,13
	infetto	1,93	6,86	8,8	1,63	1,64	3,27

In tabella sono riportati i risultati delle cinque cultivar di luppolo sane ed infette: Lubelski, Magnat, Pulawski, Sybilla e Marynka nelle rispettive concentrazioni in percentuale dei singoli composti che prendono parte alla composizione degli α -acidi e β -acidi, ricavati mediante HPLC. Tra le cultivar sane i valori di α -acidi vanno dal 3,11% in Lubelski al 14,78% in Magnat. Poniamo l'attenzione maggiormente sulla percentuale totale degli α -acidi per poter delineare un'andamento generale tra le cultivar sane ed infette. Nel caso della cultivar Lubelski la concentrazione degli α -acidi rimane pressochè costante, da 3,11% nella sana a 3,13% dell'infetta. Un comportamento opposto si nota nelle cultivar Magnat e Marynka, nella quali le concentrazioni degli α -acidi tendono a diminuire, da 14,78% nella sana a 12,8% nell'infetta in Magnat e da 9,78% nella sana all' 8,8% dell'infetta in Marynka.

Nelle cultivar di Pulawski e Sybilla si delinea una lieve diminuzione per le concentrazioni di α -acidi. Nel dettaglio: in Pulawski la concentrazione degli α -acidi cala dall'8,33% nella sana a 6,39 nell'infetta. In Sybilla la concentrazione di 4,86% degli α -acidi nella sana cala al 4,14% nell'infetta.



■ cultivar sane

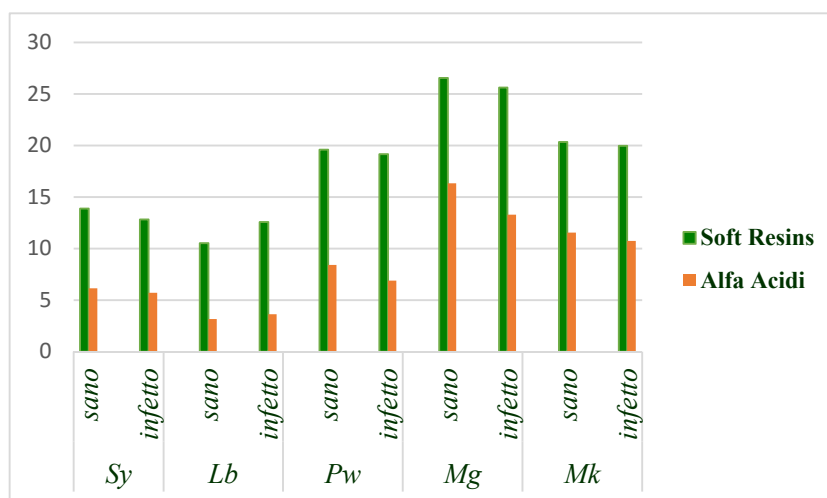
■ cultivar infette

5.2 Risultati ottenuti con il metodo Wöllmer di cinque cultivar di luppolo sano ed infetto

Tabella 2: risultati ottenuti

Varietà di Luppolo		Soft Resins	Hard Resins	Alfa Acidi	Beta Frazione
<i>Sybilla</i>	sano	13,89	0,778	6,156	7,733
	infetto	12,82	2,585	5,721	7,096
<i>Lubelski</i>	sano	10,53	2,078	3,149	7,381
	infetto	12,57	0,86	3,632	8,941
<i>Pulawski</i>	sano	19,61	1,307	8,399	11,21
	infetto	19,18	0,758	6,901	12,28
<i>Magnat</i>	sano	26,55	1,071	16,34	10,21
	infetto	25,62	1,838	13,3	12,32
<i>Marynka</i>	sano	20,35	2,249	11,54	8,809
	infetto	19,96	1,636	10,76	9,193

Nell'analisi condotta con il metodo Wöllmer è stato possibile mettere in evidenza i risultati della concentrazione delle soft resins e α -acidi. Le cultivar che hanno dato maggiori concentrazioni di soft resins sono Magnat con il 25,55% e Marynka con 20,35% nelle sane ed anche nelle cultivar infette di Magnat con il 25,62% e 19,96% in Marynka. La cultivar che presenta il maggior valore di α -acidi è quella di Magnat con 16,34% e Marynka con 11,54%. Nel confronto tra le cultivar sane ed infette non si evidenziano significative differenze.



5.3 Composizione degli Olii Essenziali dei coni di cinque cultivar di luppolo sano ed infetto

L'analisi degli olii essenziali delle cinque cultivar sane e cinque cultivar infette: Sybilla (Sy.s, Sy.i), Lubelski (Lb.s, Lb.i), Pulawski (Pw.s, Pw.i), Magnat (Mt.s, Mt.i) e Marynka (Mk.s, Mk.i) ha fornito i seguenti risultati riportati nelle tabelle sottostanti. Nelle tabelle possiamo leggere l'elenco dei componenti (nella prima colonna), i tempi di ritenzione Rt ovvero "retention time" (seconda colonna), KI o indici di Kovats (terza colonna), concentrazioni in percentuale (quarta colonna) e classi di composti (quinta colonna).

Tabella rese degli O.E ottenuti per idrodistillazione delle cinque cultivar di luppolo sano ed infetto

	Rese O.E	
	sane	infette
<i>Sy</i>	0,6	0,7
<i>Lb</i>	0,2	0,5
<i>Pw</i>	0,8	0,5
<i>Mg</i>	0,8	0,6
<i>Mk</i>	1,1	1,2

Le rese in O.E relative alle cinque cultivar non infette hanno mostrato variazioni da un valore minimo dello 0.2% in Lubelski a valori crescenti nelle altre cultivar fino all'1.1% in Marynka.

Relativamente alle rese in O.E delle cinque cultivar di luppolo infetto, si registrano variazioni simili a quelle riscontrate nelle cultivar sane. Anche in questo caso la maggiore resa si ha in Marynka con l'1.2%.

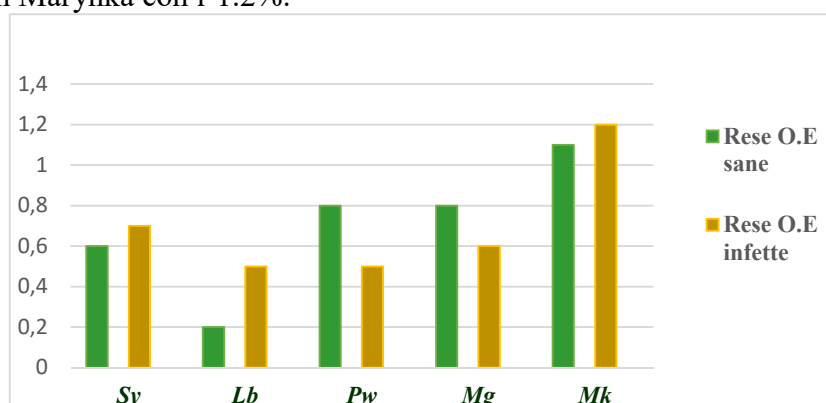


Tabella 3 degli O.E di luppolo di Sybilla (sana)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
propyl butanoate	4.200	898	tr	nt
tricyclene	4,691	932	tr	mh
β -pinene	5,756	980	0,9	mh
myrcene	6,123	991	62,8	mh
2-methyl butyl isobutyrate	6,866	1015	0,7	nt
methyl heptanoate	7,139	1023	0,5	nt
limonene	7,292	1031	1,0	mh
(E)- β -ocimene	7,941	1050	tr	mh
2-nonanone	9,515	1092	tr	nt
linalool	9,901	1098	tr	om
isopentyl isovalerate	9,805	1103	tr	nt
methyl octanoate	10,986	1120	tr	nt
2-undecanone	17,695	1292	tr	nt
methyl 4-decanoate	18,634	1311	0,4	nt
methyl geranate	19,287	1323	0,6	om
α -ylangene	21,179	1372	tr	sh
α -copaene	21,393	1376	tr	sh
(E)- β -caryophyllene	23,244	1418	5,8	sh
β -copaene	23,629	1429	0,2	sh
trans- α -bergamotene	23,979	1439	0,3	sh
α -humulene	24,699	1454	16,5	sh
(E)- β -farnesene	24,923	1558	tr	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	24,932	1470	4,4	sh
γ -muurolene	25,724	1477	0,4	sh
trans- β -guaiene	26,628	1500	tr	sh
trans- γ -cadinene	27,288	1513	0,6	sh
δ -cadinene	27,660	1524	0,9	sh
caryophyllene alcohol	29,396	1570	tr	os
caryophyllene oxide	29,659	1581	0,1	os
humulene epoxide II	31,098	1606	0,5	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Tabella 4 degli O.E di luppolo di Sybilla (infetta)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
propyl butanoate	4,200	898	tr	nt
tricyclene	4,691	932	tr	mh
β -pinene	5,727	980	1,1	mh
myrcene	6,097	991	54,4	mh
2-methyl butyl isobutyrate	6,840	1015	0,5	nt
methyl heptanoate	7,122	1023	0,4	nt
p-cymene	7,18	1026	tr	mh
limonene	7,269	1031	0,8	mh
(E)- β -ocimene	7,916	1050	0,2	mh
2-nonanone	9,515	1092	tr	nt
linalool	9,889	1098	0,3	om
isopentyl isovalerate	9,805	1103	tr	nt
methyl octanoate	10,986	1120	tr	nt
2-undecanone	17,695	1292	tr	nt
methyl 4-decanoate	18,645	1311	1,0	nt
methyl geranate	19,294	1323	1,2	om
α -copaene	21,393	1376	tr	sh
(E)- β -caryophyllene	23,261	1418	6,1	sh
β -copaene	23,629	1429	tr	sh
trans- α -bergamotene	23,979	1439	tr	sh
α -humulene	24,718	1454	16,8	sh
(E)- β -farnesene	24,923	1458	tr	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	24,953	1470	4,7	sh
γ -muurolene	25,732	1477	0,5	sh
α -selinene	26,495	1494	0,3	sh
trans- β -guaiene	26,628	1500	tr	sh
trans- γ -cadinene	27,305	1513	0,6	sh
δ -cadinene	27,701	1524	1,5	sh
benzoic acid,4-ethoxy-ethyl estere	27,827	1526	6,0	nt
caryophyllene alcohol	29,676	1570	0,2	sh
caryophyllene oxide	30,068	1581	0,4	os
n-hexadecane	30,72	1600	0,4	nt
humulene oxide II	31,141	1606	0,9	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Confronto tra le classi di composti dell'O.E tra la cultivar Sybilla sana ed infetta

CLASSI DI COMPOSTI	Sy.s		Sy.i	
	N° COMPONENTI	%	N° COMPONENTI	%
mh	5	64.7	6	56.5
om	2	0.6	2	1.5
sh	11	29.1	12	30.7
os	3	0.6	2	1.3
nt	6	0.9	9	7.8

Nei risultati della composizione dell'O.E qui riassunti possiamo osservare che nella Sybilla sana sono stati identificati 27 costituenti con una percentuale totale del 96% a differenza nella Sybilla infetta sono stati riconosciuti 31 composti con una percentuale totale del 97,8%. La classe dei composti chimici volatili presente in maggior percentuale è quella dei monoterpeni idrocarburi con il 64,7% nella sana e 56,5% nell'infetta. Appartenente a questa classe, il composto in maggior percentuale è il *mircene* con il 62,8% nella sana e 5,4% nell'infetta. Seguono i sesquiterpeni idrocarburi con il 29,1% nella sana e 30,7% nell'infetta.

Si evidenzia che i sesquiterpeni idrocarburi sono la classe con un maggior numero di composti; quelli con la percentuale più alta sono: *β-caryophyllene*, *α-humulene* e *(E)-β-farnesene*. Il *β-caryophyllene* con una percentuale pari al 5,8% nella sana e 6,1% nell'infetta. L'*α-humulene* con il 16,5% nella sana e 16,8% nell'infetta, infine *(E)-β-farnesene* presente in entrambi in traccia. I non terpeni possiedono una percentuale dello 0,9% nella sana mentre il 7,8% nell'infetta.

Nella Sybilla sana si può osservare che i monoterpeni ossigenati ed i sesquiterpeni ossigenati hanno la stessa percentuale ovvero 0,6% a differenza dell'infetta nella quale la differenza è minima, l'1,5% nei monoterpeni ossigenati e 1,3% nei sesquiterpeni ossigenati.

Composti principali	% Sy.s	% Sy.i
<i>mircene</i>	62.8	54.4
<i>β-caryophyllene</i>	5.8	6.1
<i>α-humulene</i>	16.5	16.8
<i>(E)-β-farnesene</i>	tr	tr

Tabella 5 degli O.E di luppolo di Lubelski (sana)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
(E)-2-hexenal	3,151	854	tr	nt
propyl butanoate	4,205	898	tr	nt
tricyclene	4,674	932	tr	mh
β-pinene	5,779	980	0,4	mh
myrcene	6,146	991	22,9	mh
2-methyl butyl isobutyrate	6,840	1015	tr	nt
methyl heptanoate	7,169	1023	0,2	nt
limonene	7,310	1031	0,3	mh
2-nonanone	9,518	1092	tr	nt
linalool	9,944	1098	0,2	om
nonanal	10,031	1102	0,4	nt
methyl octanoate	10,773	1120	tr	nt
2-decanone	13,590	1192	tr	nt
methyl nonanoate	15,011	1227	0,2	nt
2-undecanone	18,044	1292	0,5	nt
methyl 4-decenoate	18,700	1311	1,0	nt
methyl geranate	19,359	1323	0,2	om
α-copaene	21,462	1376	0,3	sh
(E)-β-caryophyllene	23,319	1418	9,4	sh
β-copaene	23,742	1429	0,2	sh
trans-α-bergamotene	24,049	1439	0,7	sh
α-humulene	24,779	1454	34,2	sh
(E)-β-farnesene	25,015	1458	14,9	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	25,644	1470	0,2	sh
γ-murolene	25,786	1477	0,8	sh
β-selinene	26,169	1485	0,9	sh
α-selinene	26,547	1494	1,2	sh
α-murolene	26,616	1499	tr	sh
trans-γ-cadinene	27,359	1513	1,1	sh
δ-cadinene	27,746	1524	2,0	sh
α-cadinene	27,967	1538	0,2	sh
selina- 3,7 (11) diene	28,431	1542	0,8	sh
caryophyllene alcohol	29,716	1570	0,1	sh
caryophyllene oxide	30,125	1581	0,6	os
n-hexadecane	30,879	1600	0,3	nt
humulene oxide II	31,199	1606	1,8	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Tabella 6 degli O.E di luppolo di Lubelski (infetta)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
(E)-2-hexenal	3,151	215	1,4	nt
propyl butanoate	4,201	898	tr	nt
tricyclene	4,674	932	0,1	mh
β -pinene	5,742	980	0,6	mh
6-methyl-5-hepten-2-one	6,014	985	0,8	nt
myrcene	6,107	991	29,9	mh
methyl heptanoate	7,120	1023	0,3	nt
limonene	7,265	1031	0,5	mh
linalool	9,874	1098	0,5	om
nonanal	9,969	1102	0,5	nt
2-decanone	13,590	1192	0,3	nt
methyl nonanoate	14,938	1227	0,3	nt
(E)-2-decenal	16,357	1261	0,1	nt
2-undecanone	17,959	1292	0,7	nt
methyl 4-decanoate	18,617	1311	1,8	nt
methyl geranate	19,274	1323	0,4	om
α -copaene	21,381	1376	0,2	sh
(E)- β -caryophyllene	23,230	1418	6,5	sh
β -copaene	23,629	1429	0,2	sh
trans- α -bergamotene	23,964	1439	0,9	sh
α -humulene	24,685	1454	24,5	sh
(E)- β -farnesene	24,923	1458	15,9	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	25,540	1470	0,2	sh
γ -muurolene	25,694	1477	0,6	sh
β -selinene	26,064	1485	0,4	sh
α -selinene	26,450	1494	0,4	sh
α -muurolene	26,616	1499	1,3	sh
(E,E) - α -farnesene	27,081	1508	0,5	sh
trans- γ -cadinene	27,261	1513	1,0	sh

δ -cadinene	27,650	1524	1,6	sh
α -cadinene	28,006	1538	0,2	sh
selina- 3,7 (11) - diene	28,224	1542	0,1	sh
caryophyllene alcohol	29,628	1568	0,7	sh
caryophyllene oxide	30,021	1581	1,0	os
humulene oxide II	31,090	1606	3,5	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Confronto delle classi di composti dell'O.E tra la cultivar Lubelski sana ed infetta

	Lb.s			Lb.i	
	CLASSI DI COMPOSTI	N° COMPONENTI	%	N° COMPONENTI	%
	mh	4	23.6	4	31.1
	om	2	0.3	2	0.9
	sh	16	67	17	55.2
	os	2	2.8	3	4.5
	nt	12	2.6	10	6.2

Nei risultati della composizione dell'O.E qui riassunti possiamo osservare che in Lubelski sana sono stati identificati 36 costituenti con una percentuale totale del 96,3% a differenza di Lubelski infetta con il riconoscimento di 36 composti con una percentuale totale del 97,9%. La classe dei composti chimici volatili presente in maggior percentuale è quella dei sesquiterpeni idrocarburi con il 67% nella sana e 55,2% nell'infetta.

Appartenente a questa classe, il composto in maggior percentuale è il *mircene* con il 22,9% nella sana e 29,9% nell'infetta. Seguono i monoterpeni idrocarburi con il 23,6% nella sana e 31,1% nell'infetta. Si evidenzia che i sesquiterpeni idrocarburi sono la classe con un maggior numero di composti; quelli con la percentuale più alta sono: *β-caryophyllene*, *α-humulene* e *(E)-β-farnesene*. Il *β-caryophyllene* ha una percentuale del 9,4% nella sana e 6,5% nell'infetta. L'*α-humulene* con il 34,2% nella sana e 24,5% nell'infetta; infine *(E)-β-farnesene* presente in entrambi con una percentuale poco differente tra loro, 14,9% nella sana e 15,9% nell'infetta. I non terpeni possiedono una percentuale del 2,6% nella sana mentre il 6,2% nell'infetta. In Lubelski sana i sesquiterpeni ossigenati rappresentano il 2,8% e 4,5% nell'infetta. La percentuale dei monoterpeni ossigenati nella sana è dello 0,3% mentre nell'infetta è dello 0,9%.

Componenti principali	% Lb.s	% Lb.i
<i>mircene</i>	22.9	29.9
<i>β-caryophyllene</i>	9.4	6.5
<i>α-humulene</i>	34.2	24.5
<i>(E)-β-farnesene</i>	14.9	15.9

Tabella 7 degli O.E di luppolo di Pulawski (sana)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
(E)-2-hexenal	3,177	215	0,3	nt
propyl butyrate	4,205	896	0,4	nt
β-pinene	5,754	980	0,3	mh
myrcene	6,119	991	21,9	mh
pentyl propanoate	6,744	1007	0,1	nt
2-methyl butyl isobutyrate	6,856	1015	1,4	nt
methyl heptanoate	7,134	1023	0,2	nt
limonene	7,264	1031	0,4	mh
(E)-β-ocimene	7,937	1050	0,2	mh
methyl-6-methyl heptanoate	9,335	1087	0,1	nt
2-nonanone	9,520	1092	0,2	nt
linalool	9,894	1098	1,2	om
methyl octanoate	10,771	1120	0,1	nt
2-decanone	13,609	1192	0,4	nt
methyl 4-nonenoate	14,414	1310	0,1	nt
methyl nonanoate	14,953	1227	0,2	nt
heptyl isobutyrate	15,892	1248	0,1	nt
(E)-2-decenal	16,377	1260	0,1	nt
2-undecanone	17,978	1292	1,0	nt
undecenal-9°-en-1-al	18,639	1161	0,8	nt
methyl geranate	19,291	1323	0,2	om
α-ylangene	21,199	1372	0,1	sh
α-copaene	21,402	1376	0,5	sh
(E)-β-caryophyllene	23,252	1418	15,6	sh
β-copaene	23,674	1429	0,4	sh
α-humulene	24,709	1454	36,8	sh
(E)-β-farnesene	24,943	1458	0,6	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	25,571	1470	0,4	sh
γ-muurolene	25,722	1477	1,5	sh
α-amorphene	28,857	1592	0,2	sh
β-selinene	26,097	1485	0,4	sh
α-selinene	26,473	1494	0,9	sh
α-muurolene	26,660	1499	1,5	sh
trans-γ-cadinene	27,288	1513	1,9	sh
δ-cadinene	27,676	1524	3,3	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	28,042	1538	0,2	sh
α-cadinene	28,253	1533	0,4	sh
α-calacorene	28,484	1542	0,1	sh
caryophyllene alcohol	29,666	1568	0,4	sh
caryophyllene oxide	30,055	1581	0,7	os
humulene oxide II	31,123	1606	1,6	os

Tabella 8 degli O.E di luppolo di Pulawski (infetta)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
(E)-2-hexenal	3,193	215	tr	nt
propyl butanoate	4,210	898	0,4	nt
tricyclene	4,698	932	0,2	mh
isopentyl propionate	5,585	970	0,2	nt
β -pinene	5,767	980	1,2	mh
myrcene	6,280	991	36,9	mh
pentyl propanoate	6,770	1007	0,1	nt
2-methyl butyl isobutyrate	6,885	1015	1,9	nt
methyl heptanoate	7,149	1023	0,3	nt
para-cymene	7,180	1026	tr	mh
limonene	7,303	1031	0,9	mh
(E)- β -ocimene	7,943	1050	0,2	mh
methyl-6-methyl heptanoate	9,341	1087	0,2	nt
2-nonanone	9,518	1092	0,3	nt
linalool	9,910	1098	1,8	om
methyl octanoate	10,773	1120	0,2	nt
2-decanone	13,609	1192	0,3	nt
methyl nonanoate	14,950	1227	0,2	nt
heptyl isobutyrate	15,894	1248	0,1	nt
2-undecanone	17,984	1292	0,7	nt
undecenal-9°-en-1-al	18,644	1161	0,9	nt
methyl 4-decanoate	18,887	1311	1,1	nt
methyl geranate	19,296	1323	0,7	om
γ -ylangene	21,206	1372	0,2	sh
α -copaene	21,408	1376	0,6	sh
(E)- β -caryophyllene	23,359	1418	11,6	sh
β -copaene	23,695	1429	0,4	sh
α -humulene	24,909	1454	24,8	sh
(E)- β -farnesene	24,954	1458	tr	sh

trans-cadina-1(6),4-diene	25,594	1470	0,4	sh
γ-muurolene	25,748	1477	1,1	sh
β-selinene	25,880	1485	0,2	sh
cis-β-guaiene	26,121	1490	0,4	sh
α-selinene	26,490	1494	0,8	sh
α-muurolene	26,664	1499	0,8	sh
trans-β-guaiene	26,735	1500	0,4	sh
trans-γ-cadinene	27,312	1513	1,4	sh
δ-cadinene	27,702	1524	2,7	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	28,053	1533	0,2	sh
α-cadinene	28,263	1538	0,3	sh
α-calacorene	28,491	1542	0,1	sh
caryophyllene alcohol	29,656	1568	0,3	sh
caryophyllene oxide	30,063	1581	1,0	os
humulene oxide II	31,145	1606	1,8	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Confronto delle classi di composti dell'O.E tra la cultivar Magnat sana ed infetta

CLASSI DI COMPOSTI	Mg.s			Mg.i	
	N° COMPONENTI	%	N° COMPONENTI	%	
mh	5	28.3	4	49.9	
om	2	1.3	2	0.6	
sh	19	63.9	17	41.6	
os	2	0.7	2	1.7	
nt	7	2.8	4	1.7	

Nei risultati della composizione dell'O.E qui riassunti possiamo osservare che Magnat sana sono stati identificati 35 costituenti con una percentuale totale del 97% a differenza di Magnat infetta con il riconoscimento di 29 composti ed una percentuale totale del 97,8%. L'olio essenziale di Magnat sana con è costituito per il 63,9% nella sana ed il 41,6% nell'infetta da sesquiterpeni idrocarburi. Appartenente a questa classe, il composto in maggior percentuale è il *mircene* con il 27,6% nella sana e 49,6% nell'infetta. Seguono i monoterpeni idrocarburi con il 28,3% nella sana e 49,9% nell'infetta. Si evidenzia che i sesquiterpeni idrocarburi sono la classe con un maggior numero di composti; quelli con la percentuale più alta sono: *β-caryophyllene*, *α-humulene* e *(E)-β-farnesene*. Il *β-caryophyllene* ha una percentuale del 8,1% nella sana e 6,5% nell'infetta. L'*α-humulene* con il 31,0% nella sana e 23,2% nell'infetta; infine *(E)-β-farnesene* presente nella sana la percentuale del 14,1% nella sana e 8,7% nell'infetta. I non terpeni possiedono una percentuale del 2,8% nella sana mentre il 1,7% nell'infetta. In Magnat sana i monoterpeni ossigenati rappresentano il 1,3% e 0,6% nell'infetta. La percentuale dei sesquiterpeni ossigenati nella sana è dello 0,7% mentre nell'infetta è dello 1,7%.

Componenti principali	% Mg.s	% Mg.i
<i>mircene</i>	27.6	49.6
<i>β-caryophyllene</i>	8.1	6.5
<i>α-humulene</i>	31	23.2
<i>(E)-β-farnesene</i>	14.1	8.7

Tabella 9 degli O.E di luppolo di Marynka (sana)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
propyl butanoate	4,227	898	0,7	nt
tricyclene	4.707	932	0,2	mh
β -pinene	5,801	980	1,2	mh
myrcene	6,469	991	48,5	mh
pentyl propanoate	6,852	1007	2,5	nt
2-methyl butyl isobutyrate	6,979	1015	0,4	nt
methyl heptanoate	7,217	1023	0,6	nt
limonene	7,382	1031	0,9	mh
(Z)- β -ocimene	7,649	1040	tr	mh
(E)- β -ocimene	7,997	1050	0,8	mh
γ -terpinene	8,328	1062	0,1	mh
methyl 6- methyl heptanoate	9,383	1087	0,4	nt
2-nonanone	9,559	1092	0,6	nt
linalool	9,964	1098	0,9	om
isopentyl isovalerate	10,166	1103	0,3	nt
methyl octanoate	10,818	1120	0,5	nt
2-decanone	13,647	1192	0,3	nt
methyl nonanoate	14,989	1227	0,4	nt
geraniol	16,574	1255	0,1	om
geranial	17,019	1270	0,1	om
methyl nerolate	17,419		0,1	nt
methyl 6-methyl nonanoate	17,756	1287	0,1	nt
2-undecanone	18,032	1291	0,6	nt
methyl 4-decanoate	18,721	1311	1,8	nt
methyl geranate	19,391	1323	1,9	om
α -ylangene	21,265	1372	tr	sh
α -copaene	21,448	1376	0,1	sh
(E)- β -caryophyllene	23,382	1418	4,2	sh
β -copaene	23,727	1429	0,1	sh

trans- α -bergamotene	24,063	1439	0,8	sh
α -humulene	24,918	1454	7,9	sh
(E)- β -farnesene	25,247	1458	14,6	sh
γ -murulene	25,860	1477	0,5	sh
β -selinene	26,228	1485	0,4	sh
α -selinene	26,576	1494	0,5	sh
trans- β -guaiene	26,720	1500	0,2	sh
β -bisabolene	27,175	1509	0,3	sh
trans- γ -cadinene	27,380	1513	0,7	sh
δ -cadinene	27,752	1524	0,8	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	28,093	1533	0,1	sh
α -cadinene	28,316	1538	tr	sh
α -calacorene	28,560	1542	tr	sh
caryophyllene alcohol	29,701	1568	0,1	sh
caryophyllene oxide	30,119	1581	tr	os
humulene oxide II	31,173	1606	0,1	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Tabella 10 degli O.E di luppolo di Marynka (infetta)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
propyl butanoate	4,222	898	0,4	nt
tricyclene	4.698	932	0,2	mh
β -pinene	5,771	980	1,0	mh
myrcene	6,140	991	67	mh
pentyl propanoate	6,765	1007	0,2	nt
2-methyl butyl isobutyrate	6,876	1015	1,5	nt
methyl heptanoate	7,154	1023	0,4	nt
limonene	7,312	1031	0,7	mh
(E)- β -ocimene	7,954	1050	0,3	mh
methyl 6- methyl heptanoate	9,360	1087	0,2	nt
2-nonanone	9,533	1092	0,4	nt
linalool	9,913	1098	0,8	om
isopentyl isovalerate	10,134	1103	tr	nt
methyl octanoate	10,798	1120	0,4	nt
2-decanone	13,624	1192	tr	nt
methyl nonanoate	14,983	1227	tr	nt
2-undecanone	17,998	1291	tr	nt
methyl 4-decanoate	18,721	1311	1,8	nt
methyl geranate	19,313	1323	2,0	om
α -copaene	21,426	1376	tr	sh
iso caryophyllene	23,066	1404	0,4	sh
(E)- β -caryophyllene	23,276	1418	2,7	sh
β -copaene	23,694	1429	tr	sh
trans- α -bergamotene	24,011	1439	0,4	sh
α -humulene	24,564	1454	6,5	sh
(E)- β -farnesene	24,971	1458	10,5	sh
γ -murulene	25,758	1477	tr	sh
β -selinene	26,118	1485	0,2	sh
α -selinene	26,495	1494	0,2	sh

trans- β -guaiene	26,658	1500	tr	sh
β -bisabolene	27,109	1509	tr	sh
trans- γ -cadinene	27,331	1513	0,4	sh
δ -cadinene	27,696	1524	0,2	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	27,976	1533	0,2	sh
caryophyllene oxide	30,064	1581	tr	os
humulene oxide II	31,141	1606	tr	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Confronto delle classi di composti degli O.E tra la cultivar Marynka sana ed infetta

	Mk.s			Mk.i	
CLASSI DI COMPOSTI	N° COMPONENTI	%	N° COMPONENTI	%	
mh	7	51.7	5	69.2	
om	4	3	2	2.8	
sh	18	31.3	15	21.7	
os	2	0.1	2	0	
nt	15	9.3	12	5.3	

Nei risultati della composizione dell'O.E qui riassunti possiamo osservare che in Marynka sana sono stati identificati 46 costituenti con una percentuale totale del 95,4% a differenza di Marynka infetta con il riconoscimento di 36 composti ed una percentuale totale del 99%. La classe dei composti chimici volatili presente in maggior percentuale è quella dei monoterpeni idrocarburi con il 51,7% nella sana e 69,2% nell'infetta.

Appartenente a questa classe, il composto in maggior percentuale è il *mircene* con il 48,5% nella sana e 67% nell'infetta. Seguono i sesquiterpeni idrocarburi con il 31,3% nella sana e 21,7% nell'infetta. Si evidenzia che i sesquiterpeni idrocarburi sono la classe con un maggior numero di composti; quelli con la percentuale più alta sono: *β-caryophyllene*, *α-humulene* e *(E)-β-farnesene*. Il *β-caryophyllene* ha una percentuale del 4,2% nella sana e 2,7% nell'infetta. L'*α-humulene* con il 7,9% nella sana e 6,5% nell'infetta; infine *(E)-β-farnesene* è presente per il 14,6% nella sana e 10,5% nell'infetta. I non terpeni possiedono una percentuale del 9,3% nella sana mentre il 5,3% nell'infetta. In Marynka sana i monoterpeni ossigenati rappresentano il 3% e 2,8% nell'infetta; infine la percentuale dei sesquiterpeni ossigenati nella sana è dello 0,1% mentre è assente come classe di composti nell'infetta.

Componenti principali	% Mk.s	% Mk.i
<i>mircene</i>	48.5	67
<i>β-caryophyllene</i>	4.2	2.7
<i>α-humulene</i>	7.9	6.5
<i>(E)-β-farnesene</i>	14.6	10.5

5.4 Composizione della frazione volatile emessa dai coni di cinque cultivar di luppolo sano ed infetto

L'analisi mediante SPME abbinata alla GC-MS condotta per le cinque cultivar di luppolo sano e d'infetto: Sybilla (Sy.s, Sy.i), Lubelski (Lb.s, Lb.i), Pulawski (Pw.s, Pw.i), Magnat (Mg.s, Mg.i) e Marynka (Mk.s, Mk.i), ha dato i seguenti risultati riportati nelle tabelle successive. Le tabelle sono elencate per cultivar analizzate ed in ciascuna vengono riportati: nella prima colonna sono elencati i singoli composti. Nella seconda colonna i tempi di ritenzione Rt "retention time". Nella terza gli indici di Kovats o KI. Nella quarta le percentuali di ogni componente ed infine le classi dei composti corrispondenti.

Tabella 11 della frazione volatile della cultivar di luppolo di Sybilla (sana)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
propyl butanoate	4,303	898	0,2	nt
α -pinene	4,765	939	0,7	mh
β -pinene	5,840	980	1,8	mh
myrcene	6,664	991	86,3	mh
pentyl propanoate	6,934	1007	0,2	nt
isopentyl butyrate	7,027	1018	0,6	nt
methyl heptanoate	7,266	1023	0,3	nt
limonene	7,430	1031	1,2	mh
(Z)- β -ocimene	7,673	1040	0,1	mh
(E)- β -ocimene	7,941	1050	tr	mh
methyl-6-methyl heptanoate	9,388	1087	0,1	nt
2-nonanone	9,557	1092	tr	nt
linalool	9,934	1098	0,2	om
isopentyl isovalerate	10,157	1103	tr	nt
methyl octanoate	10,794	1120	0,1	nt
n-decanal	14,105	1204	tr	nt

2-undecanone	17,934	1292	tr	nt
methyl 4-decanoate	18,592	1311	0,1	nt
methyl geranate	19,241	1323	0,2	om
α -cubebene	20,231	1351	tr	sh
α -copaene	21,344	1376	0,1	sh
(Z)-caryophyllene	22,655	1404	tr	sh
(E)- β -caryophyllene	23,234	1418	2,2	sh
β -copaene	23,608	1429	0,1	sh
trans- α -bergamotene	23,928	1439	0,1	sh
α -humulene	24,720	1454	2,8	sh
(E)- β -farnesene	24,898	1458	1,1	sh
γ -muurolene	25,650	1477	0,1	sh
trans- β -guaiene	26,896	1500	tr	sh
trans- γ -cadinene	27,203	1513	0,1	sh
δ -cadinene	27,588	1524	0,1	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	27,948	1533	tr	sh
α -cadinene	28,175	1538	tr	sh
caryophyllene oxide	29,947	1581	tr	os
humulene epoxide II	31,025	1606	tr	os

nt = non terpeni mh = monoterpeni idrocarburi om = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi os = sesquiterpeni ossigenati.

Tabella 12 della frazione volatile della cultivar di luppolo di Sybilla (infetta)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
propyl butanoate	4,362	898	tr	nt
tricyclene	4,814	932	tr	mh
β -pinene	5,876	980	1	mh
myrcene	6,298	991	74,6	mh
pentyl propanoate	6,843	1008	tr	nt
2-methyl butyl isobutyrate	6,971	1015	0,9	nt
methyl heptanoate	7,238	1023	0,4	nt
limonene	7,393	1031	1,9	mh
(E)- β -ocimene	8,031	1050	0,4	mh
methyl-6-methyl heptanoate	9,428	1087	0,3	nt
2-nonanone	9,597	1092	0,3	nt
linalool	9,984	1098	0,6	om
methyl octanoate	10,842	1120	0,1	nt
2-decanone	13,656	1192	0,1	nt
n-decanal	14,188	1204	tr	nt
methyl nonanoate	14,999	1228	tr	nt
heptyl isobutyrate	15,943	1248	tr	nt
2-undecanone	18,014	1291	tr	nt
methyl 4-decanoate	18,664	1311	0,3	nt
methyl geranate	19,315	1323	0,5	om
α -ylangene	21,232	1372	0,1	sh
α -copaene	21,432	1376	0,3	sh
(E)- β -caryophyllene	23,296	1418	5,3	sh
β -copaene	23,694	1429	0,3	sh
trans- α -bergamotene	24,013	1439	0,2	sh
α -humulene	24,766	1454	7,8	sh
(E)- β -farnesene	24,975	1458	3,1	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	25,584	1470	tr	sh
γ -muurolene	25,743	1477	0,2	sh

β -selinene	26,126	1485	tr	sh
α -selinene	26,493	1494	0,2	sh
α -muurolene	26,670	1499	tr	sh
trans- β -guaiene	26,752	1500	tr	sh
trans- γ -cadinene	27,312	1513	0,2	sh
δ -cadinene	27,692	1524	0,4	sh
caryophyllene oxide	30,068	1581	0,4	os
humulene oxide II	31,141	1606	0,9	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Confronto tra la frazione volatile delle cultivar di luppolo Sybilla sana ed infetta

Sy.s			Sy.i	
CLASSI DI COMPOSTI	N° COMPONENTI	%	N° COMPONENTI	%
mh	6	90,1	5	77,9
om	2	0,4	2	1,1
sh	14	6,7	14	15
os	2	0	0	1,3
nt	11	1,6	13	2,4

Nell'analisi della composizione dello spazio di testa della cultivar Sybilla sana ed infetta, sono stati riconosciuti 35 costituenti rispettivamente per quella sana e 36 per quella infetta. La percentuale totale è de 98,8% per la sana e 97,7% per l'infetta.

La classe dei composti chimici volatili presente in maggior percentuale è quella dei monoterpeni idrocarburi con il 90,1% nella sana e del 77,9% nell'infetta. Seguono i sesquiterpeni idrocarburi con il 6,7% nella sana mentre nell'infetta è del 15%. I non terpeni presentano una percentuale del 1,6% nella sana e 2,4% nell'infetta. Nella cultivar sana i monoterpeni ossigenati rappresentano lo 0,4% a differenza dell'1,1% nell'infetta. La presenza del 1,3% di sesquiterpeni ossigenati in Sybilla infetta non si ripresenta invece nella sana in quanto non si ha nessun riconoscimento. I composti principali evidenziati, in entrambe, con più alte concentrazioni sono: il *mircene*, appartenente alla classe dei monoterpeni idrocarburi, con 86,3% nella sana e 74,6% nell'infetta. *β-caryophyllene*, *α-humulene* e *(E)-β-farnesene* appartenenti alla classe dei sesquiterpeni idrocarburi, rispettivamente con le percentuali di 2,2% nella sana e 5,3% nell'infetta per il *β-caryophyllene*. 2,8% nella sana e 7,8% nell'infetta per quanto riguarda *α-humulene* ed infine *(E)-β-farnesene* con 1,1% nella sana e 3,1% nell'infetta.

Composti principali	% Sy.s	% Sy.i
<i>mircene</i>	86.3	74.6
<i>β-caryophyllene</i>	2.2	5.3
<i>α-humulene</i>	7.9	6.5
<i>(E)-β-farnesene</i>	14.6	10.5

Tabella 13 della frazione volatile della cultivar di luppolo Lubelski (sana)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
α -pinene	4,787	939	0,5	mh
β -pinene	5,859	980	2,6	mh
myrcene	6,519	991	87,4	mh
α -terpinene	7,025	1018	tr	nt
methyl heptanoate	7,256	1023	0,3	nt
β -phellandrene	7,418	1031	1,7	mh
(E)- β -ocimene	8,038	1050	0,1	mh
γ -terpinene	8,401	1062	tr	mh
2-nonanone	9,594	1092	0,2	nt
linalool	9,970	1098	0,3	om
methyl octanoate	10,847	1120	tr	nt
2-decanone	13,668	1192	tr	nt
methyl nonanoate	14,990	1227	tr	nt
2-undecanone	18,014	1292	tr	nt
methyl 4-decanoate	18,676	1311	0,2	nt
methyl geranate	19,326	1323	tr	om
α -ylangene	21,236	1372	tr	sh
α -copaene	21,444	1376	0,1	sh
(E)- β -caryophyllene	23,311	1418	1,6	sh
β -copaene	23,708	1429	tr	sh
trans- α -bergamotene	24,028	1439	0,2	sh
α -humulene	24,786	1454	2,9	sh
(E)- β -farnesene	24,995	1458	1,5	sh
γ -muurolene	25,770	1477	tr	sh
α -selinene	26,513	1494	tr	sh
α -muurolene	26,771	1499	tr	sh
δ -cadinene	27,708	1524	0,1	sh
α -cadinene	28,291	1538	tr	sh
caryophyllene oxide	30,096	1581	tr	os
humulene epoxide II	31,152	1606	tr	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Tabella 14 della della frazione volatile della cultivar di luppolo Lubelski (infetta)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
tricyclene	4,794	932	0,5	mh
α -pinene	5,119	939	0,1	mh
β -pinene	5,866	980	2,1	mh
myrcene	6,534	991	89,8	mh
α -terpinene	7,039	1018	tr	mh
methyl heptanoate	7,265	1023	0,5	nt
limonene	7,425	1031	1,7	mh
β -phellandrene	7,674	1031	0,1	mh
(E)- β -ocimene	8,038	1050	tr	mh
γ -terpinene	8,413	1062	tr	mh
2-nonanone	9,599	1092	0,2	nt
linalool	9,975	1098	0,2	om
methyl octanoate	10,852	1120	tr	nt
2-decanone	13,684	1192	tr	nt
methyl nonanoate	14,996	1228	tr	nt
2-undecanone	8,035	1292	tr	nt
methyl 4-decanoate	18,679	1311	0,2	nt
methyl geranate	19,330	1323	tr	om
α -ylangene	21,278	1372	tr	sh
α -copaene	21,439	1376	tr	sh
(E)- β -caryophyllene	23,300	1418	1	sh
β -copaene	23,707	1429	tr	sh
trans- α -bergamotene	24,025	1439	0,1	sh
α -humulene	24,768	1454	1,9	sh
(E)- β -farnesene	24,999	1458	1,3	sh
γ -muurolene	25,772	1477	tr	sh
β -selinene	26,127	1485	tr	sh
α -selinene	26,498	1494	tr	sh

trans- γ -cadinene	27,203	1513	tr	sh
trans- γ -cadinene	27,324	1513	tr	sh
δ -cadinene	27,693	1524	tr	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	28,066	1533	tr	sh
α -cadinene	28,276	1538	tr	sh
caryophyllene oxide	30,069	1581	tr	os
humulene epoxide II	31,148	1606	tr	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Confronto tra la frazione volatile emessa dai coni della cultivar Lubelski sana ed infetta

	Lb.s			Lb.i	
CLASSI DI COMPOSTI	N° COMPONENTI	%		N° COMPONENTI	%
mh	6	90.1		9	94.3
om	2	0.4		2	0.2
sh	14	6.7		15	4.3
os	2	0		2	0
nt	11	1.6		7	0.9

Nei risultati della composizione della frazione volatile qui riassunti possiamo osservare che in Lubelski sana sono stati identificati 35 costituenti con una percentuale totale del 98,8% a differenza di Lubelski infetta con il riconoscimento di 35 composti ed una percentuale totale

del 99,7%. La classe dei composti chimici volatili presente in maggior percentuale è quella dei monoterpeni idrocarburi con il 90,1% nella sana e 94,3% nell'infetta.

Appartenente a questa classe, il composto in maggior percentuale è il *mircene* con l'87,4% nella sana e 89,8% nell'infetta. Seguono i sesquiterpeni idrocarburi con il 6,7% nella sana e 4,3% nell'infetta. Si evidenzia che i sesquiterpeni idrocarburi sono la classe con un maggior numero di composti; quelli con la percentuale più alta sono: *β -caryophyllene*, *α -humulene* e *(E)- β -farnesene*. Il *β -caryophyllene* ha una percentuale dell'1,6% nella sana e 1,0% nell'infetta. L' *α -humulene* con il 2,9% nella sana e 1,9% nell'infetta; infine *(E)- β -farnesene* è presente per l'1,5% nella sana e 1,3% nell'infetta. I non terpeni possiedono una percentuale dell'1,6% nella sana mentre lo 0,9% nell'infetta. I monoterpeni ossigenati con lo 0,4% nella sana e 0,2% nell'infetta. Osserviamo che in entrambe i sesquiterpeni ossigenati si ritrovano in traccia.

Componenti principali	% Lb.s	% Lb.i
<i>mircene</i>	87.4	89.8
<i>β-caryophyllene</i>	1.6	1.0
<i>α-humulene</i>	2.9	1.9
<i>(E)-β-farnesene</i>	1.5	1.3

Tabella 15 della frazione volatile della cultivar di luppolo di Pulawski (sana)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
propyl butanoate	4,299	898	1,7	nt
tricyclene	4,770	932	0,6	mh
α -pinene	5,136	939	0,1	mh
β -pinene	5,844	980	2,2	mh
myrcene	6,515	991	76,4	mh
pentyl propanoate	6,874	1007	0,1	nt
isopentyl butyrate	6,996	1018	2,6	nt
methyl heptanoate	7,234	1023	0,4	nt
limonene	7,403	1031	1,1	mh
(E)- β -ocimene	8,027	1050	0,7	mh
methyl-6-methyl heptanoate	9,400	1087	0,1	nt
2-nonanone	9,572	1092	0,2	nt
linalool	9,978	1098	0,6	om
methyl octanoate	10,794	1120	0,1	nt
2-decanone	13,628	1192	0,1	nt
methyl nonanoate	14,965	1277	tr	nt
methyl 6-methyl nonanoate	17,708	1287	tr	nt
2-undecanone	17,974	1292	0,1	nt
methyl 4-decanoate	18,630	1311	0,1	nt
methyl geranate	19,291	1323	tr	om
α -cubebene	20,279	1351	tr	sh
α -ylangene	21,191	1372	0,1	sh
α -copaene	21,392	1376	0,3	sh
(E)- β -caryophyllene	23,295	1418	4,1	sh
β -copaene	23,657	1429	0,2	sh
trans- α -bergamotene	23,970	1439	tr	sh
α -humulene	24,776	1454	5,7	sh
(E)- β -farnesene	24,891	1458	tr	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	25,572	1470	tr	sh

γ -muurolene	25,694	1477	0,3	sh
β -selinene	26,075	1486	tr	sh
cis- β -guaiene	26,439	1490	0,1	sh
α -muurolene	26,679	1499	0,1	sh
trans- γ -cadinene	27,252	1513	0,2	sh
δ -cadinene	27,639	1524	0,4	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	27,999	1533	tr	sh
α -cadinene	28,225	1538	tr	sh
caryophyllene oxide	30,018	1581	tr	os
humulene epoxide II	31,085	1606	tr	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Tabella 16 della frazione volatile della cultivar di luppolo di Pulawski (infetta)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
isopentyl acetate	3,645	876	0,1	nt
propyl butanoate	4,300	898	0,8	nt
tricyclene	4,773	932	0,5	mh
α -pinene	5,119	939	0,1	mh
β -pinene	5,841	980	2,5	mh
myrcene	6,411	991	78,0	mh
methyl heptanoate	7,212	1023	0,4	nt
limonene	7,375	1031	1,0	mh
(E)- β -ocimene	8,008	1050	0,3	mh
γ -terpinene	8,332	1062	0,1	mh
2-nonanone	9,553	1092	0,2	nt
linalool	9,995	1098	0,8	om
methyl octanoate	10,802	1120	0,1	nt
2-decanone	13,624	1192	tr	nt
methyl nonanoate	14,948	1227	tr	nt
2-undecanone	17,964	1292	tr	nt
methyl 4-decanoate	18,611	1311	0,1	nt
methyl geranate	19,260	1323	0,1	om
α -cubebene	20,252	1351	tr	sh
α -ylangene	21,170	1372	0,1	sh
α -copaene	21,372	1376	0,3	sh
(E)- β -caryophyllene	23,252	1418	4,3	sh
β -copaene	23,631	1429	0,2	sh
trans- α -bergamotene	23,944	1439	tr	sh
α -humulene	24,724	1454	5,7	sh
(E)- β -farnesene	24,939	1458	tr	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	25,539	1470	tr	sh
γ -muurolene	25,669	1477	0,2	sh

β -selinene	26,058	1486	tr	sh
α -selinene	26,415	1494	0,1	sh
α -muurolene	26,656	1499	0,1	sh
(E,E)- α -farnesene	26,934	1508	tr	sh
trans- γ -cadinene	27,227	1513	0,2	sh
δ -cadinene	27,612	1524	0,3	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	27,986	1533	tr	sh
α -cadinene	28,196	1538	tr	sh
caryophyllene oxide	29,973	1581	tr	os
humulene epoxide II	31,041	1606	tr	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Confronto tra la frazione volatile emessa dai coni della cultivar Pulawski sana ed infetta

CLASSI DI COMPOSTI	Pw.s		Pw.i	
	N° COMPONENTI	%	N° COMPONENTI	%
mh	6	81.1	6	82.5
om	2	0.6	2	0.9
sh	16	11.5	16	11.5
os	2	0	2	0
nt	12	5.5	12	1.7

Nei risultati della composizione della frazione volatile qui riassunti possiamo osservare che in Pulawski sana sono stati identificati 38 costituenti con una percentuale totale del 98,7% a differenza di Pulawski infetta con il riconoscimento di 37 composti ed una percentuale totale del 96,6%. La classe dei composti chimici volatili presente in maggior percentuale è quella dei monoterpeni idrocarburi con il 81,1% nella sana e 82,5% nell'infetta. Appartenente a questa classe, il composto in maggior percentuale è il *mircene* con il 76,4% nella sana e 78,0% nell'infetta. Seguono i sesquiterpeni idrocarburi con 11,5% nella sana e 11,5% nell'infetta. Si evidenzia che i sesquiterpeni idrocarburi sono la classe con un maggior numero di composti; quelli con la percentuale più alta sono: *β-caryophyllene*, *α-humulene* e *(E)-β-farnesene*. Il *β-caryophyllene* ha una percentuale dell'4,1% nella sana e 4,3% nell'infetta. L'*α-humulene* presenta la stessa concentrazione in entrambe, ovvero il 5,7; infine *(E)-β-farnesene* sia nella sana che nell'infetta si ritrova come traccia. I non terpeni possiedono una percentuale dell'5,5% nella sana mentre lo 1,7% nell'infetta. I monoterpeni ossigenati hanno una percentuale dello 0,6% nella sana mentre nell'infetta è dello 0,9%. Possiamo notare che la classe di composti dei sesquiterpeni ossigenati si ha in traccia in entrambe.

Componenti principali	% Pw.s	% Pw.i
<i>mircene</i>	76.4	78.0
<i>β-caryophyllene</i>	4.1	4.3
<i>α-humulene</i>	5.7	5.7
<i>(E)-β-farnesene</i>	tr	tr

Tabella 17 della frazione volatile della cultivar di luppolo di Magnat (sana)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
isopentyl acetate	3,667	876	0,1	nt
propyl butanoate	4,331	898	0,3	nt
tricyclene	4,800	932	0,1	mh
α -pinene	4,849	939	0,4	mh
pentyl propanoate	5,878	972	0,1	nt
β -pinene	5,878	980	1,7	mh
myrcene	6,657	991	87,8	mh
methyl heptanoate	7,287	1023	tr	nt
limonene	7,459	1031	1	mh
(E)- β -ocimene	8,060	1050	0,4	mh
2-nonanone	9,602	1092	0,1	nt
linalool	9,988	1098	0,3	om
isopentyl isovalerate	10,188	1103	0,1	nt
methyl octanoate	10,845	1120	0,3	nt
2-decanone	13,659	1192	tr	nt
methyl nonanoate	14,985	1227	tr	nt
2-undecanone	18,001	1292	tr	nt
methyl geranate	19,310	1323	tr	om
α -cubebene	20,295	1351	tr	sh
α -ylangene	21,209	1372	tr	sh
α -copaene	21,407	1376	0,1	sh
(E)- β -caryophyllene	23,275	1418	1,5	sh
β -copaene	23,670	1429	0,1	sh
trans- α -bergamotene	23,986	1439	0,1	sh
α -humulene	24,767	1454	2,7	sh
(E)- β -farnesene	24,958	1458	1,4	sh
γ -muurolene	25,712	1477	0,1	sh
β -selinene	26,087	1486	tr	sh

α -selinene	26,462	1494	tr	sh
trans- β -guaiene	26,708	1500	tr	sh
(E,E)- α -farnesene	27,079	1508	tr	sh
trans- γ -cadinene	27,265	1513	0,1	sh
δ -cadinene	27,649	1524	0,1	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	28,014	1533	tr	sh
α -cadinene	28,223	1538	tr	sh
caryophyllene oxide	30,010	1581	tr	os
humulene epoxide II	31,083	1606	tr	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Tabella 18 della frazione volatile della cultivar di luppolo di Magnat (infetta)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
propyl butanoate	4,314	898	0,2	nt
tricyclene	4,780	932	0,4	mh
α -pinene	4,849	939	0,4	mh
β -pinene	5,852	980	2,0	mh
myrcene	6,502	991	88,2	mh
methyl heptanoate	7,248	1023	tr	nt
limonene	7,406	1031	1	mh
(E)- β -ocimene	8,025	1050	0,3	mh
linalool	9,963	1098	0,4	om
isopentyl isovalerate	10,166	1103	0,1	nt
methyl octanoate	10,817	1120	tr	nt
methyl nonanoate	14,980	1227	tr	nt
2-undecanone	18,014	1292	tr	nt
methyl geranate	19,307	1323	tr	om
α -cubebene	20,297	1351	tr	sh
α -ylangene	21,228	1372	tr	sh
α -copaene	21,421	1376	0,1	sh
(E)- β -caryophyllene	23,280	1418	1,5	sh
β -copaene	23,681	1429	0,1	sh
trans- α -bergamotene	24,002	1439	0,1	sh
α -humulene	24,761	1454	2,9	sh
(E)- β -farnesene	24,967	1458	1,3	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	25,590	1470	tr	sh
γ -muurolene	25,732	1477	0,1	sh
β -selinene	26,094	1486	tr	sh
α -selinene	26,484	1494	tr	sh
trans- β -guaiene	26,742	1500	tr	sh
(E,E)- α -farnesene	27,115	1508	tr	sh
trans- γ -cadinene	27,293	1513	0,1	sh
δ -cadinene	27,649	1524	0,1	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	28,036	1533	tr	sh
α -cadinene	28,262	1538	tr	sh
caryophyllene oxide	30,057	1581	tr	os
humulene oxide II	31,121	1606	tr	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Confronto tra la frazione volatile emessa dai coni della cultivar Magnat sana ed infetta

CLASSI DI COMPOSTI	Mg.s		Mg.i	
	N° COMPONENTI	%	N° COMPONENTI	%
mh	6	91.4	6	92.3
om	2	0.3	2	0.4
sh	17	6.2	18	6.3
os	2	0	2	0
nt	10	1	6	0.3

Nei risultati della composizione della frazione volatile qui riassunti possiamo osservare che in Magnat sana sono stati identificati 37 costituenti con una percentuale totale del 98,9% a differenza di Magnat infetta con il riconoscimento di 34 composti ed una percentuale totale del 99,3%. La classe dei composti chimici volatili presente in maggior percentuale è quella dei monoterpeni idrocarburi con il 91,4% nella sana e 92,3% nell'infetta. Appartenente a questa classe, il composto in maggior percentuale è il *mircene* con l'87,8% nella sana e 88,2% nell'infetta. Seguono i sesquiterpeni idrocarburi con il 6,2% nella sana e 6,3% nell'infetta. Si evidenzia che i sesquiterpeni idrocarburi sono la classe con un maggior numero di composti; quelli con la percentuale più alta sono: *β -caryophyllene*, *α -humulene* e *(E)- β -farnesene*. Il *β -caryophyllene* ha la stessa percentuale in entrambe, ovvero dell'1,5%. L' *α -humulene* con il 2,7% nella sana e 2,9% nell'infetta; infine *(E)- β -farnesene* è presente per l'1,4% nella sana e 1,3% nell'infetta.

I non terpeni possiedono una percentuale dell'1% nella sana mentre lo 0,3% nell'infetta. I monotrpeni ossigenati sono in percentuale dello 0,3% nella sana e 0,4% nell'infetta. Infine osserviamo che sia nella sana che nell'infetta i sesquiterpeni ossigenati sono in traccia.

Componenti principali	% Mg.s	% Mg.i
<i>mircene</i>	87.8	88.2
<i>β-caryophyllene</i>	1.5	1.5
<i>α-humulene</i>	2.7	2.9
<i>(E)-β-farnesene</i>	1.4	1.3

Tabella 19 della frazione volatile della cultivar di luppolo di Marynka (sana)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
isopentyl acetate	3,659	876	0,2	nt
propyl butanoate	4,314	898	1	nt
tricyclene	4,787	932	0,6	mh
pentyl propanoate	5,704	972	0,2	nt
β -pinene	5,872	980	1,9	mh
myrcene	6,79	991	83,3	mh
methyl heptanoate	7,114	1023	2,2	nt
limonene	7,325	1031	0,5	mh
β -phellandrene	7,495	1031	1,1	mh
(Z)- β -ocimene	7,732	1040	0,1	mh
(E)- β -ocimene	8,084	1050	1,2	mh
2-nonanone	9,609	1092	0,3	nt
linalool	10,035	1098	0,3	om
isopentyl isovalerate	10,205	1103	0,2	nt
methyl octanoate	10,853	1120	0,3	nt
2-decanone	13,673	1192	tr	nt
methyl nonanoate	14,995	1227	0,9	nt
2-undecanone	18,011	1292	tr	nt
methyl geranate	19,329	1323	0,2	om
α -cubebene	20,305	1351	tr	sh
α -ylangene	21,238	1372	tr	sh
α -copaene	21,448	1376	tr	sh
(E)- β -caryophyllene	23,317	1418	1,3	sh
β -copaene	23,709	1429	tr	sh
trans- α -bergamotene	24,025	1439	0,2	sh
α -humulene	24,790	1454	1,5	sh
(E)- β -farnesene	25,059	1458	2,4	sh
γ -muurolene	25,766	1477	tr	sh
β -selinene	26,139	1486	tr	sh
α -selinene	26,510	1494	tr	sh
trans- γ -cadinene	27,322	1513	tr	sh
δ -cadinene	27,701	1524	0,1	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	28,065	1533	tr	sh
α -cadinene	28,274	1538	tr	sh
caryophyllene oxide	29,980	1581	tr	os
humulene epoxide II	31,046	1606	tr	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Tabella 29: frazione volatile della cultivar di luppolo di Marynka (infetta)

Composto	Rt	KI	%	Classe di composti
isopentyl acetate	3,644	876	0,1	nt
propyl butanoate	4,305	898	0,9	nt
tricyclene	4,775	932	0,8	mh
pentyl propanoate	5,712	972	0,1	nt
β -pinene	5,875	980	2,1	mh
myrcene	6,730	991	87,5	mh
methyl heptanoate	7,131	1023	1,4	nt
limonene	7,334	1031	0,3	mh
(E)- β -ocimene	7,733	1050	tr	mh
β -phellandrene	7,505	1031	0,8	mh
(Z)- β -ocimene	8,076	1040	0,6	mh
2-nonanone	9,609	1092	0,3	nt
linalool	9,998	1098	0,2	om
isopentyl isovalerate	10,183	1103	0,1	nt
methyl octanoate	10,829	1120	0,2	nt
2-decanone	13,626	1192	tr	nt
methyl nonanoate	14,967	1227	tr	nt
2-undecanone	17,966	1292	tr	nt
methyl 4-decenoate	18,621	1311	0,1	nt
methyl geranate	19,274	1323	0,3	om
α -cubebene	20,254	1351	tr	sh
α -ylangene	21,177	1372	tr	sh
α -copaene	21,372	1376	tr	sh
(E)- β -caryophyllene	23,244	1418	0,9	sh
β -copaene	23,631	1429	tr	sh
trans- α -bergamotene	23,952	1439	0,1	sh
α -humulene	24,706	1454	1	sh
(E)- β -farnesene	24,958	1458	1,5	sh
γ -muurolene	25,678	1477	tr	sh

β -selinene	26,052	1486	tr	sh
α -selinene	26,424	1494	tr	sh
trans- γ -cadinene	27,233	1513	tr	sh
δ -cadinene	27,621	1524	0,1	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	27,976	1533	tr	sh
α -cadinene	28,188	1538	tr	sh
caryophyllene oxide	29,980	1581	tr	os
humulene epoxide II	31,046	1606	tr	os

nt = non terpeni *mh* = monoterpeni idrocarburi *om* = monoterpeni ossigenati

sh = sesquiterpeni idrocarburi *os* = sesquiterpeni ossigenati.

Confronto tra la frazione volatile emessa dai coni della cultivar di Marynka sana ed infetta

CLASSI DI COMPOSTI	Mk.s		Mk.i	
	N° COMPONENTI	%	N° COMPONENTI	%
mh	7	88.7	7	92.1
om	2	0.5	2	0.5
sh	15	5.5	15	3.6
os	2	0	2	0
nt	10	5.3	11	3.7

Nei risultati della composizione della frazione volatile qui riassunti possiamo osservare che in Marynka sana sono stati identificati 36 costituenti con una percentuale totale del 100%

a differenza di Marynka infetta con il riconoscimento di 37 composti ed una percentuale totale del 99,9%. La classe dei composti chimici volatili presente in maggior percentuale è quella dei monoterpeni idrocarburi con il 88,7% nella sana e 92,1% nell'infetta. Appartenente a questa classe, il composto in maggior percentuale è il *mircene* con l'83,3% nella sana e 87,5% nell'infetta. Seguono i sesquiterpeni idrocarburi con il 5,5% nella sana e 3,6% nell'infetta. Si evidenzia che i sesquiterpeni idrocarburi sono la classe con un maggior numero di composti; quelli con la percentuale più alta sono: *β -caryophyllene*, *α -humulene* e *(E)- β -farnesene*. Il *β -caryophyllene* ha una percentuale dell'1,3% nella sana e 0,9% nell'infetta. L' *α -humulene* con il 1,5% nella sana e 1% nell'infetta; infine *(E)- β -farnesene* è presente per il 2,4% nella sana e l'1,5% nell'infetta. I non terpeni possiedono una percentuale del 5,3% nella sana mentre il 3,7% nell'infetta. Si può osservare che in entrambe i monoterpeni ossigenati hanno la stessa percentuale dello 0,5% ed i sesquiterpeni ossigenati sono presenti in traccia.

Componenti principali	% Mk.s	% Mk.i
<i>mircene</i>	83.3	87.5
<i>β-caryophyllene</i>	1.3	0.9
<i>α-humulene</i>	1.5	1
<i>(E)-β-farnesene</i>	2.4	1.5

6- Conclusioni

Dalle analisi effettuate con HPLC e metodo Wöllmer sugli acidi amari e resine totali non sono state evidenziate significative differenze nelle concentrazioni tra le cultivar sane ed infette.

Dalle analisi gascromatografiche effettuate sia sugli olii essenziali che sulle frazioni volatili che sulle frazioni volatili dei coni di cinque diverse cultivar di luppolo sano ed infetto raccolti in Polonia, non si evidenzino significative differenze di composizione, relative alle diverse percentuali di alcuni costituenti principali, che potrebbero essere riconducibili all'attacco di virus e viroidi.

6.1 Confronto tra la composizione degli Olii Essenziali dei coni di cinque cultivar di luppolo sano ed infetto

Tabella 1 riassuntiva della composizione degli O.E delle cinque cultivar di luppolo sano

Composto	KI	%Sybilla	%Lubelski	%Pulawski	%Magnat	%Marynka	Classi di composti
(E)-2-hexenal	854		tr	0.3			nt
isopentyl acetate	876						nt
propyl butanoate	898	tr	tr		tr	0.7	nt
tricyclene	932	tr	tr		tr	0.2	mh
α -pinene	939						mh
β -pinene	980	0.9	0.4	0.3	0.3	1.2	mh
myrcene	991	62.8	22.9	21.9	27.6	48.5	mh
2-methyl butyl isobutyrate	1015	0.7	tr	1.4	0.3	0.4	nt
methyl heptanoate	1023	0.5	0.2	0.2		0.6	nt
limonene	1031	1.0	0.3	0.4	0.4	0.9	mh
β -phellandrene	1031						mh
(E)- β -ocimene	1050	tr		0.2	tr	0.8	mh
γ -terpinene	1062					0.1	mh
methyl-6-methyl heptanoate	1087			0.1		0.4	nt
2-nonanone	1092	tr	tr	0.2		0.6	nt
linalool	1098	tr	0.2	1.2	0.9	0.9	om
nonanal	1102		0.4				nt
isopentyl isovalerate	1103	tr				0.3	nt
methyl octanoate	1120	tr	tr	0.1		0.5	nt
2-decanone	1192		tr	0.4	0.2	0.3	nt
methyl nonanoate	1227		0.2	0.2	tr	0.4	nt
2-undecanone	1292	tr	0.5	1	0.8	0.6	nt
methyl 4-decenoate	1311	0.4	1		1.5	1.8	nt
undec-9e-en-1-al	1315				tr		nt
methyl geranate	1323	0.6	0.2	0.2	0.4	1.9	nt
α -cubebene	1351						sh
α -ylangene	1372	tr		0.1		tr	sh
α -copaene	1376	tr	0.3	0.5	0.3	0.1	sh
(E)- β -caryophyllene	1418	5.8	9.4	15.6	8.1	4.2	sh
β -copaene	1429	0.2	0.2	0.4	0.2	0.1	sh
trans- α -bergamotene	1439	0.3	0.7		0.7	0.8	sh
α -humulene	1454	16.5	34.2	36.8	31	7.9	sh
(E)- β -farnesene	1458	tr	14.9	0.6	14.1	14.6	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	1470	4.4	0.2	0.4	0.3		sh
γ -muurolene	1477	0.4	0.8	1.5	0.8	0.5	sh
β -selinene	1486		0.9	0.4	0.3	0.4	sh
α -selinene	1494		1.2	0.9	0.6		sh
α -muurolene	1499		tr	1.5	0.9		sh
trans- β -guaiene	1500	tr			0.9	0.2	sh
(E,E)- α -farnesene	1508				tr		sh
trans- γ -cadinene	1513	0.6	1.1	1.9	1.6	0.7	sh
δ -cadinene	1524	0.9	2	3.3	2.1		sh
trans-cadina-1(2),4-diene	1533			0.2		0.1	sh
α -cadinene	1538		0.2	0.4	0.2	tr	sh
caryophyllene alcohol	1570	tr	0.1	0.4	0.5	0.1	os
caryophyllene oxide	1581	0.1	0.6	0.7	0.4	tr	os
humulene oxide II	1606	0.5	0.3	1.6	0.3	0.1	os

In tutte le cinque le cultivar sane, i composti in maggior percentuale presenti nell'O.E sono:

- *myrcene*
- *β -caryophyllene*
- *α -humulene*
- *(E)- β -farnesene*

Nelle cultivar Sybilla e Marynka il composto in maggior percentuale è il *myrcene* con il 62.8% e 48.5% mentre in Lubelski, Pulawski e Magnat i valori sono vicini tra loro (22.9%, 21.9% e 27.6%). Nelle cultivar Lubelski, Pulawski e Magnat il composto in maggior percentuale è l' *α -humulene* con i valori 34.2%, 36.8% e 31.0%. Solo in Sybilla il composto *(E)- β -farnesene* è presente in traccia.

Tabella 2 riassuntiva della composizione degli O.E di cinque cultivar di luppolo infetto

Composto	KI	%Sybilla	%Lubelski	%Pulawski	%Magnat	%Marynka	Classi di composti
(E)-2-hexenal	854		1.4	tr			ntnt
isopentyl acetate	876						nt
propyl butanoate	898	tr	tr	0.4	tr	0.4	nt
tricyclene	932	tr	0.1	0.2	tr	0.2	mh
α -pinene	939						mh
β -pinene	980	1.1	0.6	1.2	0.8	1	mh
myrcene	991	54.4	29.9	36.9	49.6	67	mh
2-methyl butyl isobutyrate	1015	0.5		1.9	0.4	1.5	nt
methyl heptanoate	1023	0.4	0.3	0.3		0.4	nt
limonene	1031	0.8	0.5	tr	tr	0.7	mh
β -phellandrene	1031						mh
(E)- β -ocimene	1050	0.2		0.2		0.3	mh
γ -terpinene	1062						mh
methyl-6-methyl heptanoate	1087			0.2		0.2	nt
2-nonanone	1092	tr		0.3		0.4	nt
linalool	1098	0.3	0.5	1.8	0.6	0.8	om
nonanal	1102		0.5				nt
isopentyl isovalerate	1103	tr				tr	nt
methyl octanoate	1120	tr		0.2		0.4	nt
2-decanone	1192		0.3	0.3		tr	nt
methyl nonanoate	1227		0.3	0.2		tr	nt
2-undecanone	1292	tr	0.7	0.7	tr	tr	nt
methyl 4-decenoate	1311	1	1.8	1.1	1.3	1.8	nt
methyl geranate	1323	1.2	0.4	0.7	tr	2	nt
α -cubebene	1351						sh
α -ylangene	1372			0.2			sh
α -copaene	1376	tr	0.2	0.6	tr	tr	sh
(E)- β -caryophyllene	1418	6.1	6.5	11.6	6.5	2.7	sh
β -copaene	1429	tr	0.2	0.4	tr	tr	sh
trans- α -bergamotene	1439	tr	0.9		0.6	0.4	sh
α -humulene	1454	16.8	24.5	24.8	23.2	6.5	sh
(E)- β -farnesene	1458	tr	15.9	tr	8.7	10.5	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	1470	4.7	0.2	0.4	0.2		sh
γ -muurolene	1477	0.5	0.6	1.1	0.5	tr	sh
β -selinene	1486		0.4	0.2	tr	0.2	sh
α -selinene	1494	0.3	0.4	0.8	0.3	0.2	sh
α -muurolene	1499		1.3	0.8	0.1		sh
trans- β -guaiene	1500	tr		0.4	tr	tr	sh
(E,E)- α -farnesene	1508		0.5		0.5		sh
trans- γ -cadinene	1513	0.6	1	1.4	1.2	0.4	sh
δ -cadinene	1524	1.5	1.6	2.7	1.6	0.2	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	1533			0.2	tr	0.2	sh
α -cadinene	1538		0.2	0.3	tr		sh
caryophyllene alcohol	1570	0.2	0.7	0.3	tr		os
caryophyllene oxide	1581	0.4	1	1	0.4	tr	os
humulene oxide II	1606	0.9	3.5	1.8	1.3	tr	os

In tutte le cinque le cultivar infette, i composti in maggior percentuale presenti nell'O.E sono:

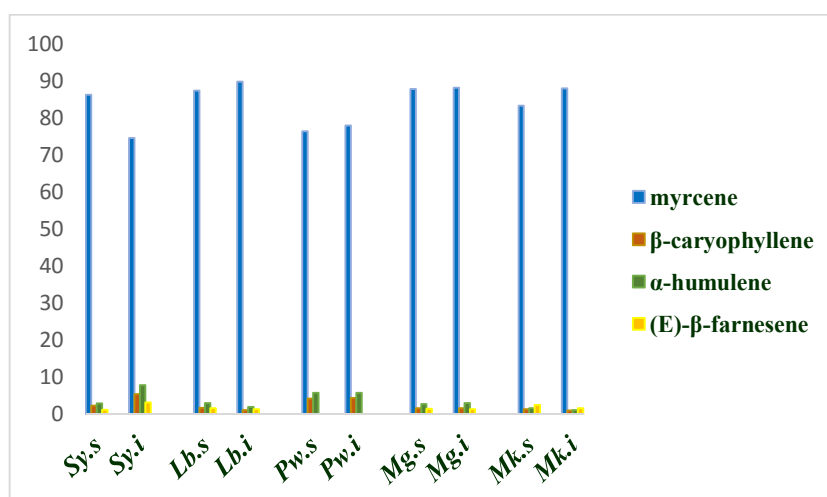
- *myrcene*
- *β -caryophyllene*
- *α -humulene*
- *(E)- β -farnesene*

Negli O.E delle cultivar infette il composto in maggior percentuale è il *myrcene*.

Osserviamo però che il *myrcene* ha percentuali maggiori nelle cultivar Sybilla e Marynka, 54.4% e 67%, rispetto a valori minori in Lubelski, Pulawski e Magnat (29.9%, 36.9% e 49.6%). L' *α -humulene* è costantemente inferiore al *myrcene* in tutte le cinque le cultivar infette. In Sybilla e Pulawski *(E)- β -farnesene* è presente in traccia.

Tabella 3 riassuntiva dei componenti principali presenti negli O.E delle cinque cultivar di luppolo sano ed infetto

	Sy.s	Sy.i	Lb.s	Lb.i	Pw.s	Pw.i	Mg.s	Mg.i	Mk.s	Mk.i
<i>myrcene</i>	86.3	74.6	87.4	89.8	76.4	78.0	87.8	88.2	83.3	88.0
<i>β-caryophyllene</i>	2.2	5.3	1.6		14.1	4.3	1.5	1.5	1.3	0.9
<i>α-humulene</i>	2.8	7.8	2.9	1.9	5.7	5.7	2.7	2.9	1.5	1.0
<i>(E)-β-farnesene</i>	1.1	3.1	1.5	1.3	tr	tr	1.4	1.3	2.4	1.5



Anche nel confronto tra le cinque cultivar sane ed infette in generale, ad eccezione di Sybilla, in tutte le altre cultivar il *myrcene* è in percentuale maggiore nelle infette. Si osserva un aumento di *myrcene* per le cultivar infette Lubelski, Pulawski e Magnat.

Invece l'*α-humulene* in tutte le cultivar infette risulta inferiore rispetto alle sane, evidenziando una diminuzione di percentuale nelle cultivar infette di Lubelski, Pulawski e Magnat ad eccezione di Sybilla.

Tabella 4 riassuntiva delle classi di composti presenti negli O.E delle cinque cultivar di luppolo sano ed infetto

O.E Sane	<i>Sy.s</i>	<i>Lb.s</i>	<i>Pw.s</i>	<i>Mg.s</i>	<i>Mk.s</i>
mh	64.7	23.6	22.8	28.3	51.7
om	0.6	0.3	1.4	1.3	3.0
sh	29.1	67.0	65.2	63.9	31.3
os	0.6	2.8	2.3	0.7	0.1
nt	0.9	2.6	5.6	2.8	9.3

Nelle classi di composti dell'O.E delle cultivar di luppolo sano, riscontriamo che i monoterpeni idrogenati ed i sesquiterpeni idrogenati sono in maggior percentuale in tutte le cultivar. In Sybilla e Marynka la classe di composti in maggior percentuale è quella dei monoterpeni idrogenati con il 64.7% e 51.7%, rispetto alle altre tre cultivar che vanno dal valore del 22.8% al 28.3%. In Lubelski, Pulawski e Magnat sono maggiori i sesquiterpeni idrogenati rispettivamente 67.0%, 65.2%, 63.9% mentre in Sybilla e Marynka sono minori (29.1% E 31.3%).

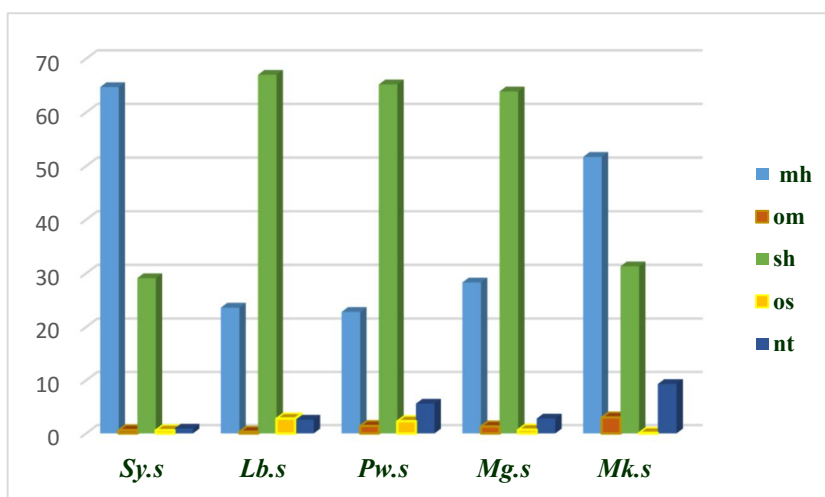


Tabella 5 riassuntiva delle classi di composti presenti negli O.E delle cinque cultivar di luppolo infetto

O.E Infette	<i>Sy.i</i>	<i>Lb.i</i>	<i>Pw.i</i>	<i>Mg.i</i>	<i>Mk.i</i>
mh	56.5	31.1	39.1	49.9	69.2
om	1.5	0.9	2.5	0.6	2.8
sh	30.7	55.2	46.5	41.6	21.7
os	1.3	0.4	3.4	1.7	
nt	7.8	6.2	6.9	1.7	5.3

Tra le classi di composti dell'O.E delle cultivar infette si riscontra la stessa situazione delle sane, ovvero le classi dei monoterpeni idrocarburi e sesquiterpeni idrocarburi sono in percentuali maggiori rispetto al resto delle classi di composti. Il valore minimo dei monoterpeni idrogenati è in Sybilla con il 14.1% fino ad arrivare al valore massimo in Marynka con il 69.2%. Per i sesquiterpeni i valori maggiori sono in Lubelski con il 55.2% ed un valore minimo in Marynka con il 21.7%.

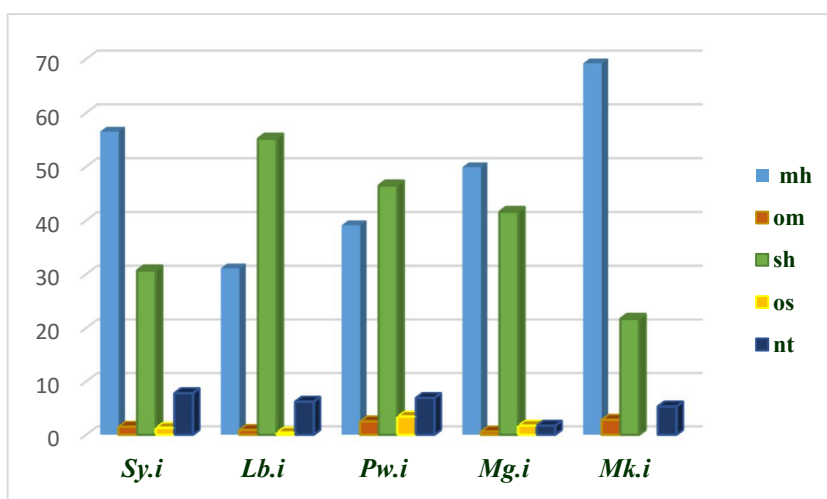
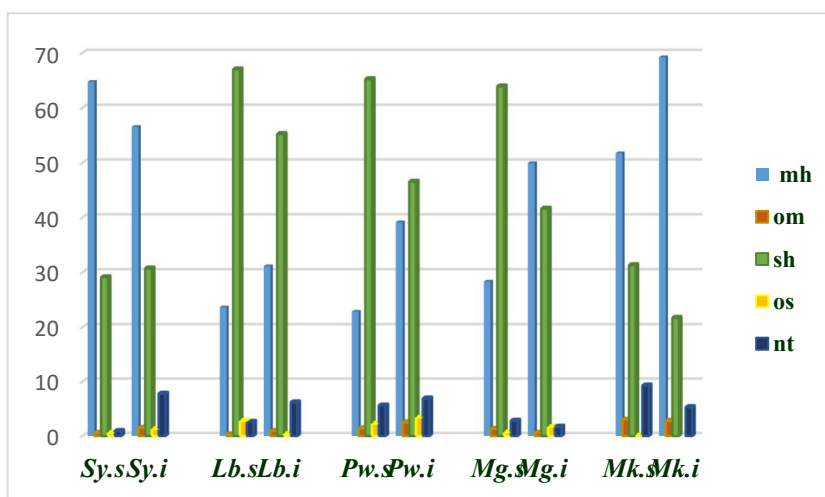


Tabella 6 riassuntiva delle classi di composti degli O.E delle cinque cultivar di luppolo sano ed infetto

O.E Sane	<i>Sy.s</i>	<i>Sy.i</i>	<i>Lb.s</i>	<i>Lb.i</i>	<i>Pw.s</i>	<i>Pw.i</i>	<i>Mg.s</i>	<i>Mg.i</i>	<i>Mk.s</i>	<i>Mk.i</i>
mh	64.7	56.5	23.6	31.1	22.8	39.1	28.3	49.9	51.7	69.2
om	0.6	1.5	0.3	0.9	1.4	2.5	1.3	0.6	3.0	2.8
sh	29.1	30.7	67.0	55.2	65.2	46.5	63.9	41.6	31.3	21.7
os	0.6	1.3	2.8	0.4	2.3	3.4	0.7	1.7	0.1	
nt	0.9	7.8	2.6	6.2	5.6	6.9	2.8	1.7	9.3	5.3

Nel confronto tra le cinque cultivar sane ed infette si può fare una considerazione complessiva: in Lubelski, Pulawski, Magnat e Marynka i monoterpeni idrogenati presentano maggiori concentrazioni nelle infette rispetto alle sane, con tendenza ad aumentare dalle sane alle infette ad eccezione di Sybilla. Invece per i sesquiterpeni idrogenati l'andamento è opposto ai monoterpeni idrogenati, la tendenza dei sesquiterpeni idrogenatio è avere valori inferiori nelle infette per le cultivar Lubelski, Pulawski, Magnat e Marynka ad eccezione di Sybilla.



6.2 Confronto tra la composizione della frazione volatile emessa dai coni di cinque cultivar di luppolo sano ed infetto

Tabella 6 riassuntiva della frazione volatile delle cinque cultivar di luppolo sano

Composto	KI	%Sybilla	%Lubelski	%Pulawski	%Magnat	%Marynka	Classi di composti
isopentyl acetate	876			0.1		0.1	nt
propyl butanoate	898	tr		0.8	0.2	0.9	nt
tricyclene	932	tr	0.5	0.5	0.4	0.8	mh
α -pinene	939		0.1	0.1	0.4		mh
β -pinene	980	1	2.1	2.5	2	2.1	mh
myrcene	991	74.6	89.8	78	88.2	88	mh
methyl heptanoate	1023	0.4	0.5	0.4	tr	1.4	nt
limonene	1031	1.9	1.7	1	1	0.3	mh
β -phellandrene	1031		0.1			0.8	mh
(E)- β -ocimene	1050	0.4	tr	0.3	0.3	tr	mh
γ -terpinene	1062		tr	0.1			mh
2-nonanone	1092	0.3	0.2	0.2		0.3	nt
linalool	1098	0.6	0.2	0.8	0.4	0.2	om
isopentyl isovalerate	1103				0.1	0.1	nt
methyl octanoate	1120	0.2	tr	0.1	tr	0.2	nt
2-decanone	1192	0.1	tr	tr		tr	nt
methyl nonanoate	1227	tr	tr	tr	tr	tr	nt
2-undecanone	1292	tr	tr	tr	tr	tr	nt
methyl 4-decenoate	1311	0.3	0.2	0.1		0.1	nt
methyl geranate	1323	0.3	tr	0.1	tr	0.3	nt
α -cubebene	1351			tr	tr	tr	sh
α -ylangene	1372	0.1	tr	0.1	tr	tr	sh
α -copaene	1376	0.3	tr	0.3	0.1	tr	sh
(E)- β -caryophyllene	1418	5.3	1	4.3	1.5	0.9	sh
β -copaene	1429	0.3	tr	0.2	0.1	tr	sh
trans- α -bergamotene	1439	0.2	0.1	tr	0.1	0.1	sh
α -humulene	1454	7.8	1.9	5.7	2.9	1	sh
(E)- β -farnesene	1458	3.1	1.3	tr	1.3	1.5	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	1470	tr		tr	tr		sh
γ -muurolene	1477	0.2	tr	0.2	0.1	tr	sh
β -selinene	1486	tr	tr	tr	tr	tr	sh
α -selinene	1494	0.2	tr	0.1	tr	tr	sh
α -muurolene	1499	tr		0.1			sh
trans- β -guaiene	1500	tr			tr		sh
(E,E)- α -farnesene	1508			tr	tr		sh
trans- γ -cadinene	1513	0.2	tr	0.2	0.1	tr	sh
δ -cadinene	1524	0.4	tr	0.3	0.1	0.1	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	1533		tr	tr	tr	tr	sh
α -cadinene	1538		tr	tr	tr	tr	sh
caryophyllene oxide	1581	0.4	tr	tr	tr	tr	os
humulene oxide II	1606	0.9	tr	tr	tr	tr	os

I costituenti che presentano le maggiori percentuali nell'indagine SPME delle cultivar sane sono i seguenti:

- *myrcene*
- *β -caryophyllene*
- *α -humulene*
- *(E)- β -caryophyllene*

In tutte le cultivar sane il *myrcene* è il composto con percentuale più elevata, con valori compresi 76.4% in Pulawski e 87.8% in Marynka. Le percentuali dell' *α -humulene* variano dall'1.5% in Marynka al 5.7% in Pulawski.

Tabella 7 riassuntiva della frazione volatile delle cinque cultivar di luppolo infetto

Composto	KI	%Sybilla	%Lubelski	%Pulawski	%Magnat	%Marynka	Classi di composti
isopentyl acetate	876			0.1		0.1	nt
propyl butanoate	898	tr		0.8	0.2	0.9	nt
tricyclene	932	tr	0.5	0.5	0.4	0.8	mh
α -pinene	939		0.1	0.1	0.4		mh
β -pinene	980	1	2.1	2.5	2	2.1	mh
myrcene	991	74.6	98.8	78	88.2	88	mh
methyl heptanoate	1023	0.4	0.5	0.4	tr	1.4	nt
limonene	1031	1.9	1.7	1	1	0.3	mh
β -phellandrene	1031		0.1			0.8	mh
(E)- β -ocimene	1050	0.4	tr	0.3	0.3	tr	mh
γ -terpinene	1062		tr	0.1			mh
2-nonanone	1092	0.3	0.2	0.2		0.3	nt
linalool	1098	0.6	0.2	0.8	0.4	0.2	om
isopentyl isovalerate	1103				0.1	0.1	nt
methyl octanoate	1120	0.2	tr	0.1	tr	0.2	nt
2-decanone	1192	0.1	tr	tr		tr	nt
methyl nonanoate	1227	tr	tr	tr	tr	tr	nt
2-undecanone	1292	tr	tr	tr	tr	tr	nt
methyl 4-decenoate	1311	0.3	0.2	0.1		0.1	nt
methyl geranate	1323	0.3	tr	0.1	tr	0.3	nt
α -cubebene	1351			tr	tr	tr	sh
α -ylangene	1372	0.1	tr	0.1	tr	tr	sh
α -copaene	1376	0.3	tr	0.3	0.1	tr	sh
(E)- β -caryophyllene	1418	5.3	1	4.3	1.5	0.9	sh
β -copaene	1429	0.3	tr	0.2	0.1	tr	sh
trans- α -bergamotene	1439	0.2	0.1	tr	0.1	0.1	sh
α -humulene	1454	7.8	1.9	5.7	2.9	1	sh
(E)- β -farnesene	1458	3.1	1.3	tr	1.3	1.5	sh
trans-cadina-1(6),4-diene	1470	tr		tr	tr		sh
γ -muurolene	1477	0.2	tr	0.2	0.1	tr	sh
β -selinene	1486	tr	tr	tr	tr	tr	sh
α -selinene	1494	0.2	tr	0.1	tr	tr	sh
α -muurolene	1499	tr		0.1			sh
trans- β -guaiene	1500	tr			tr		sh
(E,E)- α -farnesene	1508			tr	tr		sh
trans- γ -cadinene	1513	0.2	tr	0.2	0.1	tr	sh
δ -cadinene	1524	0.4	tr	0.3	0.1	0.1	sh
trans-cadina-1(2),4-diene	1533		tr	tr	tr	tr	sh
α -cadinene	1538		tr	tr	tr	tr	sh
caryophyllene oxide	1581	0.4	tr	tr	tr	tr	os
humulene oxide II	1606	0.9	tr	tr	tr	tr	os

Anche nelle cultivar infetta, il myrcene risulta il costituente in più elevata percentuale con valori sostanzialmente simili a quelli delle cultivar sane, compresi fra 74.6% in Sybilla e 89.8% in Lubelski. L' α -humulene ha valori che variano dall'1.3% in Lubelski e Magnat ad un valore massimo del 3.1% in Sybilla.

Tabella 8 riassuntiva della composizione della frazione volatile delle cinque cultivar di luppolo sano ed infetto

	Sy.s	Sy.i	Lb.s	Lb.i	Pw.s	Pw.i	Mg.s	Mg.i	Mk.s	Mk.i
<i>myrcene</i>	62.8	54.4	22.9	29.9	21.9	36.9	27.6	49.6	48.5	67
<i>β-caryophyllene</i>	5.8	6.1	9.4	6.3	15.6	11.6	8.1	6.5	4.2	2.7
<i>α-humulene</i>	16.5	6.8	34.2	24.5	36.8	24.8	31	23.2	7.9	6.1
<i>(E)-β-farnesene</i>	tr	tr	14.9	15.9	0.6	tr	14.1	8.7	14.6	10.5

Anche nel confronto tra le cinque cultivar sane ed infette in generale, ad eccezione di Sybilla, in tutte le altre cultivar il *myrcene* è in percentuale maggiore nelle infette. Si osserva un aumento di *myrcene* per le cultivar infette Lubelski, Pulawski e Magnat.

Invece l'*α-humulene* in tutte le cultivar infette risulta inferiore rispetto alle sane.

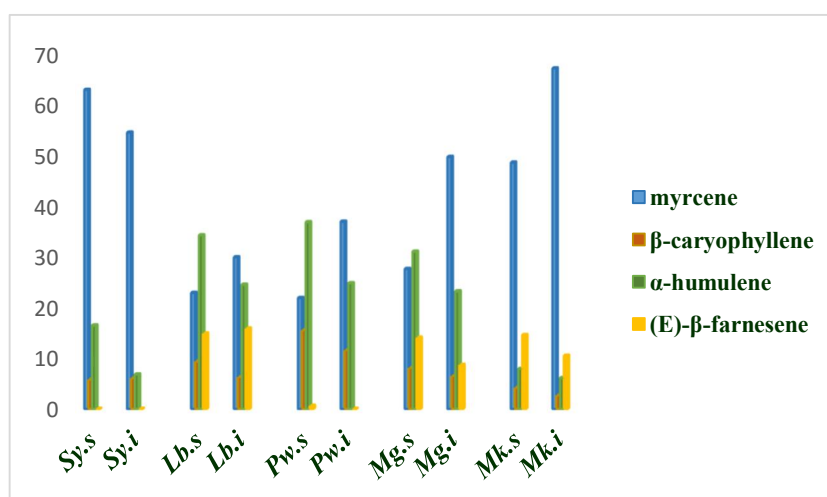


Tabella 10 riassuntiva delle classi di composti della frazione volatile emessa dalle cinque cultivar di luppolo sano

SPME	<i>Sy.s</i>	<i>Lb.s</i>	<i>Pb.s</i>	<i>Mg.s</i>	<i>Mk.s</i>
mh	90.1	90.1	81.1	91.4	88.7
om	0.4	0.4	0.6	0.3	0.4
sh	6.7	6.7	11.5	6.2	6.3
os					
nt	1.6	1.6	5.5	1	3

Nell'indagine SPME relativa alle cultivar sane, la classe con elevate percentuali è quella dei monoterpeni idrocarburi in percentuali comprese fra 81.1% in Pulawski e 91.4% in Magnat. Segue la classe dei sesquiterpeni idrocarburi con valori compresi 5.5% in Marynka e 11.5% in Pulawski. Da segnalare le basse percentuali di monoterpeni ossigenati e non terpeni ed il mancato riconoscimento della classe dei sesquiterpeni ossigenati.

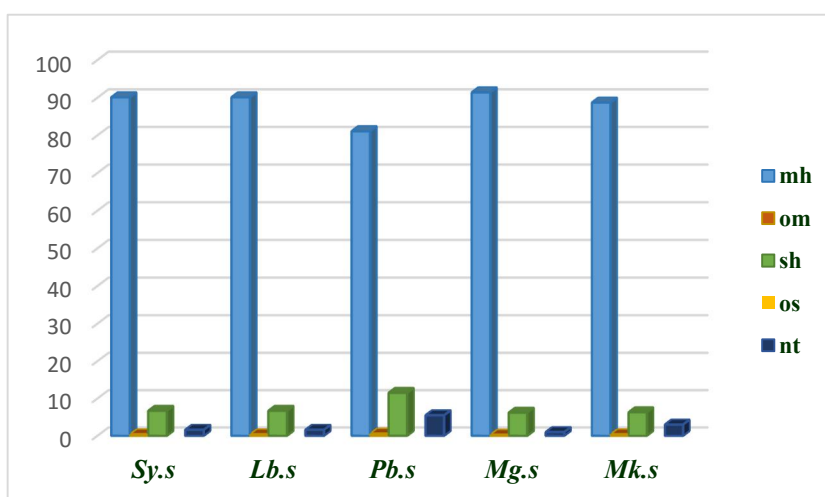


Tabella 11 riassuntiva delle classi di composti della frazione volatile delle cinque cultivar di luppolo infetto

SPME	<i>Sy.i</i>	<i>Lb.i</i>	<i>Pb.i</i>	<i>Mg.i</i>	<i>Mk.i</i>
mh	77.9	94.3	82.5	92.3	92.1
om	1.1	0.2	0.9	0.4	0.5
sh	15	4.3	11.5	6.3	3.6
os	1.3				
nt	2.4	0.9	1.7	0.3	3.7

Anche nel caso del SPME delle cultivar infette, i monoterpeni idrocarburi sono presenti in maggiori percentuali con il 77.9% in Sybilla e 94.3% in Lubelski. I monoterpeni ossigenati sono minori dell'1% in tutte le cultivar. L'altra classe in maggiori percentuali è quella dei sesquiterpeni idrocarburi dal valore minimo del 3.6% in Marynka al 15.0% in Sybilla. Possiamo notare che la classe dei sesquiterpeni ossigenati non è presente nel riconoscimento.

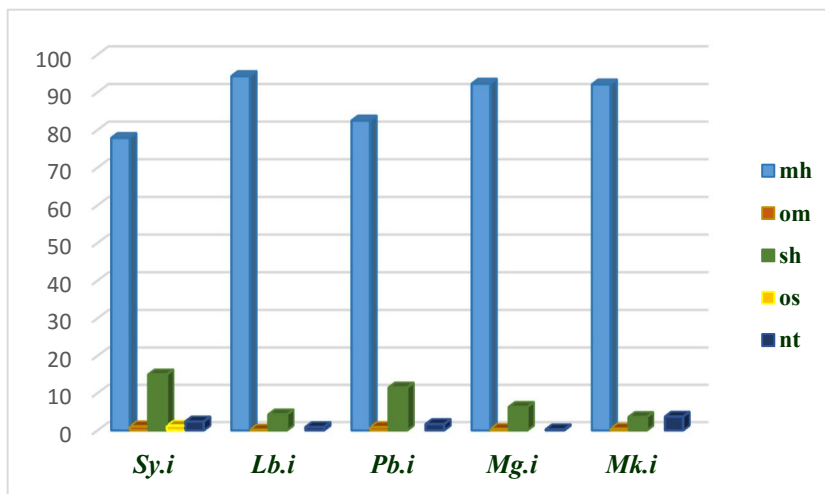
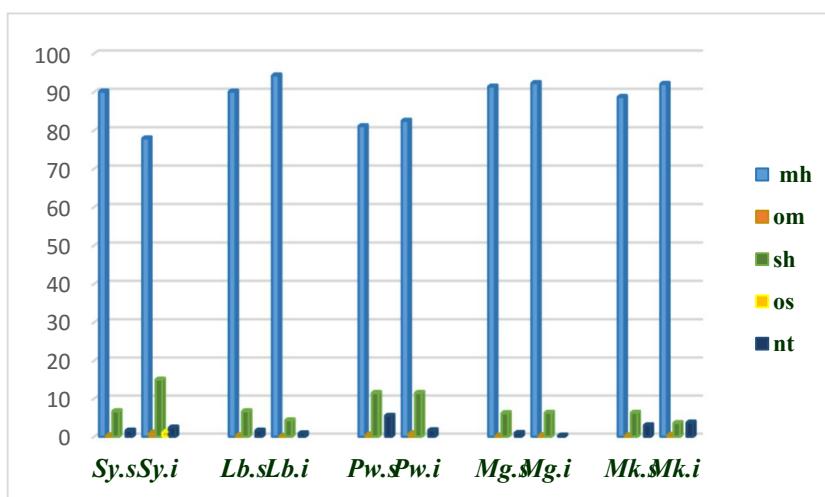


Tabella 12 riassuntiva delle classi di composti della frazione volatile delle cultivar di luppolo sano ed infetto

SPME	<i>Sy.s</i>	<i>Sy.i</i>	<i>Lb.s</i>	<i>Lb.i</i>	<i>Pw.s</i>	<i>Pw.i</i>	<i>Mg.s</i>	<i>Mg.i</i>	<i>Mk.s</i>	<i>Mk.i</i>
mh	90.1	77.9	90.1	94.3	81.1	82.5	91.4	92.3	88.7	92.1
om	0.4	1.1	0.4	0.2	0.6	0.9	0.3	0.4	0.4	0.5
sh	6.7	15	6.7	4.3	11.5	11.5	6.2	6.3	6.3	3.6
os		1.3								
nt	1.6	2.4	1.6	0.9	5.5	1.7	1	0.3	3	3.7

Nel confronto tra le cinque cultivar sane ed infette si può fare una considerazione complessiva: in Lubelski, Pulawski, Magnat e Marynka i monoterpeni idrogenati presentano maggiori concentrazioni nelle infette rispetto alle sane, con tendenza ad aumentare dalle sane alle infette ad eccezione di Sybilla. Invece per i sesquiterpeni idrogenati l'andamento è opposto ai monoterpeni idrogenati, la tendenza dei sesquiterpeni idrogenati è avere valori inferiori nelle infette per le cultivar Lubelski, Pulawski, Magnat e Marynka ad eccezione di Sybilla.



7- Bibliografia

- Giovanni Appendino. Luppolo e Birra. Piante Medicinali. Scienza nella tradizione. S.I.FIT. pp.55, 2011.
- Francesco Capasso, Raffaele Capasso. Dipartimento di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli Federico II. Piante medicinali. L'Erborista. pp.22-23, 2009.
- S.I.FIT. Piante Medicinali. Scienza nella tradizione. 56,2011
- Engles G, Juan J. Hops. "Humulus lupulus L." *HerbalGram*. 2006.
- Evans CW, ed. "Hops" in Trease and Evans Pharmacognosy. 13 ed. Bailliere Tindall; London and Philadelphia, 1989.
- Prof. Ing. Václav Rybáček, Ph. D. Hop production. Developments in crop science; 16. 1991.
- Dr. Martin Biendl, Dr. Christoph Pinzl. Hops and Health. pp. 18-37. 2008.
- Hänsel e Wagener, 1967; Stocker, 1967.
- Denise De Keukeleire. University of gent-Faculty of pharmaceutical Science. Fundamentals of beer and hop chemistry. 23(1) 2000.
- C. Schönberger and T. Kostecky. Journal of Institute of Brewing. Vol.117,3,2011. (125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing).
- R. Wohlfart, R. Hänsel et H. Schmidt Nachweis sedative-hypnotischer Wirkstoffe in hopfen. IV Mitteilung: die PharmaKologie des Hopfen. Inhaltstoffes 2-methyl 3-buten 2-ol. *Planta Med*. 48 1983.
- Koetter U., Schrader E., Käufeler R. et Al., "Prospective clinical study to demonstrate clinica efficacy of a fixed caleriam hops extracts combination in patients suffering from non-organic sleep disorder". *Phytother Res*. 2007.
- Butterweck V., Brattström A., Grundmann O. et Al., "Hypothermic effects of hops are antagonized with the competitive melatonin receptor antagonist luzindole in mice" j. *Pharmacy Pharmacol*. 2007.
- Marjan Van Cleemput, Ko Cattoor, Karolien De Bosscher, Guy Haegeman, Denis De Keukeleire and Arne Heyerick. "Hop (*Humulus lupulus*) - Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. 2008.

- Milligram S.R., Kalita J.C., Heyerick A., Rong H., De Cooman L., De Keukeleire D. (1999). Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Jan F. Stevens, Jonathan E. Page. “Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health”. 2004.
- Sarah J. Pethybridge and Frank S. Hay et Al. *Plant Disease. Viruses and Viroids infecting hop: significance, Epidemiology and Management*. Vol. 92 No. 3. 2008.
- Monika Agacka, Dr. Urszula Skomra, Dr. Mieczysław Stasiak. *Polish hop cultivars*. 2010.
- Morelli I., Flamini G., Pistelli L., 2005 – “Manuale dell’erborista- Biosintesi, estrazione e identificazione delle sostanze di origine vegetale”, pp. 125-135. 250-252. *Tecniche Nuove*, Milano. 2005.
- Urszula Skomra et Al. *Content and composition of bitter acids and essential oil in hop plants free from viruses and Hop latent viroid*. 2012.
- Urszula Skomra, et Al. *Improvement of Polish hop cultivars by elimination of viruses and Hop latent viroid using in vitro cultures*.
- Karolina Kurska, et Al. *The effect of explant size on regeneration and elimination of viruses and hop latent viroid from hop*.